



**Master Biologie, Géosciences, Agronomie, Environnement
Spécialité : Biologie Fonctionnelle des Plantes**

**Parcours : M2 Professionnel
Génomique et Technologies Avancées des Plantes**

Année Universitaire 2005-2006

**Etude de l'expression de gènes impliqués dans la
tolérance au stress oxydatif chez *Hevea brasiliensis*
en réponse à différents traitements.**

Virginie GEBELIN

CIRAD Montpellier, IFC, Michelin

Encadrants : Pascal Montoro et Julie Leclercq

Soutenu le 19 Juin 2006

Membre du jury : Bruno TOURAINÉ
Christian JAY-ALLEMAND
Guilhem DESBROSSES
Jean-Louis NOYER

Dominique THIS
Eric LACOMBE
Fabrice VAROQUAUX
Pascal GANTET

Pierre BERTHOMIEU
Pierre CZERNIC
Michel ROSSIGNOL

Le CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement), créé en 1984, est un Etablissement Public à Caractère Industriel et Commercial (EPIC) placé sous la double tutelle du Ministère de la Recherche et du Ministère des Affaires Etrangères. Il est issu du regroupement, en un établissement unique, des instituts de recherche agronomique spécialisés sur différentes productions agricoles tropicales, créés à l'époque coloniale, et adaptés ensuite aux enjeux de la recherche agronomique tropicale et de la coopération avec les pays du Sud. En 2005, le CIRAD adopte une organisation en une soixantaine d'unités de recherches (UR) dont certaines sont communes à plusieurs institutions de recherche et de formation agronomique (Unité Mixte de Recherche : UMR). L'Institut Français du caoutchouc (IFC) dont la société Michelin fait partie, finance, entre autres, les recherches du programme *Biologie du développement de l'hévéa et de la production de caoutchouc naturel* effectuées au CIRAD dans l'UMR 1057 (Biologie du développement des espèces pérennes cultivées ; UMR BEPC).

L'IFC est né à la suite de la signature de l'accord sur la réglementation internationale du caoutchouc en mai 1934. Cette association de planteurs, qui autrefois participait activement à la recherche, ne contribue aujourd'hui à ces travaux, qu'en tant que partenaire financier.

La société Michelin, numéro 1 mondial du pneumatique avec 19,4% du marché, représente un chiffre d'affaire de 15 590 millions d'euros, emploie 129 000 personnes à travers le monde dont 4000 chercheurs en Europe, Amérique de Nord et Asie. Leur couverture géographique s'étend à 170 pays, dont 71 sites industriels dans 19 pays. Ma rencontre avec Françoise Granet, chercheuse Michelin, m'a permis de cerner l'intérêt pour Michelin de maintenir une expertise et une présence stratégique en hévéaculture, conscient d'une part de l'intérêt économique et social que représente cette culture pour les pays producteurs, et d'autre part de la fragilité du système de production de caoutchouc naturel. Pour cela, la société Michelin entretient des partenariats scientifiques avec plusieurs instituts : CIRAD, IRD, INRA, IRRDB, CEPLAC et EMBRAPA au Brésil et YITC en Chine, ainsi qu'avec plusieurs universités françaises et brésiliennes. En exploitant six plantations (deux au Brésil et quatre au Nigeria), Michelin poursuit un double objectif : participer au progrès du secteur par l'amélioration et le partage des connaissances, et ainsi pérenniser les ressources en caoutchouc naturel de qualité. Ces six plantations ne représentent que 5% de ses besoins en

caoutchouc naturel (contenu dans le latex des hévéas), les 95% restant sont fournis par des coopératives de petits planteurs principalement en Asie du Sud-Est. L'hévéaculture est une source de revenus pour de nombreuses familles, contribuant ainsi à limiter l'exode rural. De plus les revenus générés par les plantations industrielles permettent de financer la construction d'infrastructures comme des écoles, des hôpitaux ou des logements.

Doté de propriétés physiques remarquables, le caoutchouc naturel demeure l'élastomère le plus approprié dans de nombreuses applications, notamment dans les pneus poids lourd et dans le génie civil. Le prix du caoutchouc naturel (1,56 € /kg en moyenne au 1^{er} trimestre 2006) doit rester compétitif face à la concurrence du caoutchouc synthétique et celle des autres productions agricoles des zones tropicales. En cas de pénurie de caoutchouc naturel, l'industrie du pneumatique devrait lui substituer des élastomères synthétiques issus du pétrole dont le prix ne cesse d'augmenter (73\$/baril en juin 2006). Outre les qualités spécifiques qu'il confère au pneumatique, le recours au caoutchouc naturel permet donc de préserver des ressources fossiles. De plus, souvent planté sur des terres entièrement déboisées, l'hévéa constitue une couverture forestière qui participe à la protection des sols.

L'hévéaculture est un investissement de longue durée (25-30ans), il comprend une période non productive, dite « immature », pendant environ cinq à huit ans, jusqu'à une norme moyenne de mise en saignée de 50 cm de circonférence du tronc à un mètre du sol. Cette caractéristique entraîne **un retour sur investissement très long**. Une plantation comporte 500 arbres par hectare et le meilleur rendement se situe à en moyenne 1,2 à 1,5 tonnes par hectare et par an. L'exploitation de culture intercalaire permet de valoriser le terrain pour les planteurs d'hévéa, surtout pendant la période immature. Le bois de l'hévéa est également exploité de façon croissante au moment de l'abattage des parcelles âgées, principalement pour la fabrication de petit mobilier, le bois devenant le deuxième produit de valorisation de l'hévéaculture.

Les planteurs rencontrent plusieurs problèmes agronomiques liés à l'itinéraire cultural. Les variétés cultivées sont des clones de greffe qui sont formés d'une partie aérienne génétiquement homogène et d'un système racinaire porte-greffe issu de graine et génétiquement hétérogène. Les arbres sont stimulés par des applications périodiques sur l'encoche de saignée d'un mélange générateur d'éthylène dans l'écorce. L'**éthylène**, hormone végétale, est capable d'activer le fonctionnement métabolique, notamment l'écoulement et la

régénération du latex. Selon les zones écologiques, l'hévéaculture est confrontée à des maladies différentes affectant soit le système racinaire (*Fomes lignosus*, *Fomes noxius*), soit le panneau de saignée (*Phytophthora*), soit les feuilles (*Microcyclus*, *Colletricum*, *Corynespora*, *Phytophthora*.....). La mise en saignée provoque un fort ralentissement de la croissance en épaisseur du tronc responsable d'un déséquilibre entre la hauteur de l'arbre et la taille du tronc, pouvant entraîner la casse au vent. De plus, les arbres saignés, soumis à des contraintes d'exploitation (intensité des saignées et stimulation éthylénique) ou environnementales (sécheresse, qualité du sol), peuvent cesser de produire du latex et conduit au syndrome de l'**encoche sèche**. Ce syndrome, qui se traduit par un arrêt total ou partiel de l'écoulement du latex, est devenu une **priorité** dans les programmes de recherche en hévéaculture. Il se produit un dysfonctionnement des cellules qui produisent le latex (cellules laticifères) et *in fine* la coagulation du latex. Ce phénomène est expliqué en partie par l'apparition d'un **stress oxydatif** correspondant à la production anormale d'espèces activées de l'oxygène (AOS : Activated Oxygen Species) capables de dégrader les membranes cellulaires des lutoïdes (organites présents dans le latex) libérant des agents coagulants (hévéine,...).

L'équipe, dans laquelle j'ai été accueillie, regroupe six chercheurs travaillant sur l'embryogenèse somatique, sur l'étude du fonctionnement physiologique du matériel végétal issu de la culture *in vitro*, sur l'évaluation agronomique des plants entiers et des plants greffés juvéniles (greffon provenant de vitroplants) en champ, ainsi que sur la sélection et la propagation de clones de porte-greffe. Deux projets de recherche concernent davantage l'étude de la tolérance au stress oxydatif et les mécanismes moléculaires coordonnés par l'éthylène sur des jeunes plants greffés en serre. Mon projet participe, quant à lui, à la compréhension du comportement du jeune plant greffé. En effet, grâce à l'analyse de l'expression de gènes candidats impliqués dans la réponse au stress oxydatif par RT-PCR semi-quantitative, les réponses du jeune plant greffé, face à différents traitements, seront approfondies. Cette première étape de caractérisation sera ensuite validée par une analyse sur des arbres en exploitation puis par une analyse physiologique et moléculaire de plants d'hévéa transgéniques sur-exprimant ou sous-exprimant le(s) gène(s) d'intérêt.

SOMMAIRE

ABREVIATION

<u>I Objectif et contexte</u>	1
<u>II Résultats</u>	7
1) <u>Impact du cycle circadien sur l'expression de gènes</u>	7
2) <u>Expression de gènes en réponse à un stress lumineux</u>	8
3) <u>Expression de gènes en réponse à un stress froid</u>	8
4) <u>Expression de gènes en réponse à un stress hydrique : la sécheresse</u>	8
5) <u>Expression de gènes en réponse à un excès d'eau</u>	9
6) <u>Expression de gènes en réponse à un traitement éthylène</u>	9
7) <u>Expression de gènes en réponse à une blessure</u>	10
<u>III Discussion et conclusions</u>	12
<u>IV Matériels et méthodes</u>	16
1) <u>Matériel végétal</u>	16
2) <u>Traitement et applications de stress abiotiques</u>	16
Stress froid	16
Stress lumineux	16
Stress hydrique	16
L'éthylène	17
La blessure	17
3) <u>Extraction et purification des ARNs totaux</u>	17
4) <u>Synthèse d'ADNc</u>	18
5) <u>La RT PCR semi-quantitative</u>	19
6) <u>Analyse des photos</u>	19

ABREVIATIONS :

ADN : acide désoxyribonucléique

AOS : Activated Oxygen Species

APX : ascorbate peroxydase

ARN : acide ribonucléique

BEPC : Biologie des espèces pérennes cultivées

CAT : catalase

CEPLAC : Comissao executiva do plano da Lavoura Cacaueira

CIRAD : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

CuZnSOD : cuivre zinc superoxyde dismutase

EMBRAPA : Brazilian agricultural research corporation

EPIC : Etablissement Public à Caractère Industriel et Commercial

FeSOD : fer superoxyde dismutase

GCL : glutamyl-cystéine ligase

HMGS : β -hydroxy- β -méthylglutaryl-CoA synthase

HMGR : β -hydroxy- β -méthylglutaryl-CoA réductase

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

IFC : Institut Français du caoutchouc

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

IPP : pyrophosphate d'isopentenyle

IRD : Institut de recherche pour le developpement

IRRDB : International rubber research and development board

MnSOD : manganèse superoxyde dismutase

¹O₂ : singulet d'oxygène

O₂⁻ : anion superoxyde

OH[•] : radical hydroxyle

REF : Rubber Elongation Factor

RT-PCR : Reverse transcriptase – Polymerase chain reaction

SOD : superoxyde dismutase

UR : Unité de Recherche

UMR : Unité Mixte de Recherche

I Objectif et contexte

L'objectif de ce travail est d'étudier l'expression de gènes candidats impliqués dans la tolérance au stress oxydatif, en réponse à différents stress abiotiques ou traitements appliqués aux jeunes plants greffés. Compte tenu des difficultés de travailler sur une plante pérenne tropicale telle que l'hévéa, le jeune plant greffé, cultivé en serre, est le matériel le plus approprié pour étudier les effets des stress comparables à ceux que peuvent subir les arbres en plantations. Les résultats obtenus sur ces jeunes plants seront confirmés sur les arbres adultes en exploitation.

Il existe plusieurs milliers d'espèces de plantes à latex. La composition du latex est variable suivant l'espèce. Environ 2500 espèces contiennent du caoutchouc naturel (cis-1-4 polyisoprène) (Compagnon, 1986; Mooibroek and Cornish, 2000). Dans le passé, de nombreuses plantes ont servi à l'extraction de caoutchouc, notamment pendant la seconde guerre mondiale. Le genre *Hevea* (famille des Euphorbiaceae) se compose de dix espèces, mais actuellement, seule l'espèce *Hevea brasiliensis* est économiquement rentable et cultivée (Jacob et al., 1995).

Les particules de caoutchouc sont en suspension colloïdale dans le latex. Le latex n'est pas une sève mais constitue le cytoplasme de cellules spécialisées appelées laticifères (figure 1 et 2) (de Fay et al., 1989). Ces cellules s'étendent à toutes les parties de l'arbre (feuilles, troncs, racines) mais seul le tronc, facilement accessible, est exploité. Les cellules laticifères sont anastomosées entre elles et constituent un réseau, arrangé en anneaux concentriques dans le phloème, appelé manteau laticifère. Cette organisation va faciliter l'écoulement du latex lors de la saignée (d'Auzac et al., 1997), celle-ci ne sectionnant que les manteaux laticifères tout en préservant le cambium, générateur des tissus du bois et du liber. Entre deux manteaux se trouvent de grandes cellules parenchymateuses et des tubes criblés transportant la sève élaborée contenant le saccharose, précurseur de la biosynthèse de caoutchouc. Des rayons médullaires, disposés horizontalement, relient le liber et les vaisseaux du bois, permettant les échanges d'eau et d'éléments minéraux (d'Auzac et al., 1997; Jacob et al., 1995).

Comme les autres cytoplasmes, le latex contient un réticulum cytoplasmique, un appareil de Golgi et des ribosomes. Ni mitochondrie, ni noyau ne se retrouvent dans le latex

récolté, ceux-ci restant accrochés au plasmalemme. Ce phénomène est primordial pour le processus de régénération du latex entre deux saignées (d'Auzac et al., 1997). Un grand nombre de protéines du latex ont été identifiées dont la cis-prenyltransférase (Cornish, 1993; Light and Dennis, 1989) et un facteur d'élongation du caoutchouc (Rubber Elongation Factor : REF), deux enzymes impliquées dans la synthèse du polyisoprène (Dennis and Light, 1989). Une glycoprotéine impliquée dans la coagulation du latex, l'hévéine, a été aussi isolée et caractérisée (Gidrol et al., 1994). On retrouve aussi différents types d'ARN dans le latex récolté, permettant l'étude du génome exprimé dans les cellules laticifères. Certains gènes sont préférentiellement exprimés dans le latex (Kush et al., 1990; Pujade-Renaud et al., 1994). C'est le cas, pour la forme cytosolique de la glutamine synthase. D'autres gènes sont dix à cent fois plus exprimés dans le latex, tels que la β -hydroxy- β -méthylglutaryl-CoA synthase (HMGS) et réductase (HMGR) impliquées dans la synthèse des isoprènes (Hepper and Audley, 1969).

Le latex est composé de **trois formes de particules** : les **particules de caoutchouc** (30 à 50% de la matière sèche) (Kekwick, 1989), de micro-vacuoles lysosomales appelées **lutoïdes** (figure 3) (Archer, 1960; d'Auzac et al., 1995), ainsi que des organites possédant une double membrane : **particules de Frey-Wyssling**. Les particules de caoutchouc (entre 60nm et 6 μ m de diamètre) contiennent essentiellement des molécules de cis-polyisoprène. Chaque particule est entourée par une membrane monocouche phospholipoglycoprotéique qui lui donne une charge négative qui lui assure sa stabilité (d'Auzac et al., 1997). Le caoutchouc naturel est un polymère provenant de l'enchaînement d'une molécule à cinq carbones, le pyrophosphate d'isopentenyle (IPP). Sa synthèse a pour origine le saccharose produit par la photosynthèse (figure 4) (Bandurski and Teas, 1957; d'Auzac et al., 1997; Hepper and Audley, 1969). Ce sucre est absorbé activement au niveau de la membrane plasmique des cellules laticifères. Le saccharose est hydrolysé en deux molécules, une de glucose et une de fructose par une invertase. Ces molécules permettent la conversion en molécules d'acétyl-CoA, qui conduisent à l'IPP. Les maillons d'IPP s'accrochent sur le polymère en formation par l'intermédiaire d'une « rubber transferase » (Light and Dennis, 1989) associée à un facteur d'élongation (REF) localisé sur la membrane entourant la particule de caoutchouc (Dennis and Light, 1989). Cette fixation de plusieurs milliers d'unités d'IPP, se fait toujours en configuration *cis*, ce qui donne à la molécule une très grande régularité, à la base des qualités technologiques du caoutchouc naturel.

La quantité de latex, récolté après les saignées, dépend de la durée et de la vitesse d'écoulement. La vitesse d'écoulement varie selon les clones, la durée restant le facteur limitant de la production. Un autre facteur va influencer sur la production du latex, la capacité de régénération du contenu des laticifères entre deux saignées. La recherche de stimulants chimiques, susceptibles d'augmenter la production de latex, représente un grand enjeu de l'hévéaculture. De nombreuses molécules ont été testées, mais les remarquables effets de la stimulation par l'éthylène supplante, jusqu'à présent, tout autre composé. L'application d'un générateur d'éthylène, l'acide 2-chloroéthyl-phosphonique ou Ethrel® permet d'augmenter la durée de l'écoulement du latex en activant le métabolisme des laticifères et en particulier les antioxydants (Audley et al., 1976). La stimulation modifie le pH du latex et accélère la glycolyse. On observe alors une augmentation du pool adénylique, des polysomes et des ARN ribosomiaux qui indique une activation du métabolisme. De plus, plusieurs activités enzymatiques sont spécialement modulées par l'éthylène (figure 5) (Coupé and Chrestin, 1989; d'Auzac et al., 1997; Jacob et al., 1995), comme celle de l'ATPase plasmalemmique (qui permet une entrée de saccharose) et de nombreuses enzymes impliquées dans la glycolyse telle que l'invertase.

La saignée constitue, en soi, un traumatisme auquel vient s'ajouter le traumatisme de la stimulation hormonale. Si les stress sont indispensables à l'obtention du latex, ils ne doivent pas dépasser une certaine limite. En effet, la surexploitation et l'abus de la stimulation entraînent une baisse de la production en raison d'un arrêt de l'écoulement plus ou moins rapide du latex (l'encoche sèche) (Jacob et al., 1994). Ce phénomène réversible est provoqué par une coagulation du latex au sein des manteaux laticifères. Le traitement à l'Ethrel® provoque une activation de la NADH-oxydase (Chrestin, 1985). Cette NADH-oxydase située sur la membrane des lutoïdes produit des formes actives d'oxygène (AOS), essentiellement l'anion superoxyde (O_2^-) (Chrestin et al., 1985). Les AOS s'attaquent alors aux membranes des organites cellulaires, notamment celle des lutoïdes, qui libèrent à leur tour, des agents coagulants et provoquent la coagulation du latex (figure 6). En effet, les lutoïdes renferment en quantité importante l'hévéine, protéine qui appartient à la famille des lectines et découverte en 1960 par Archer (Archer, 1960; Gidrol et al., 1994). Deux mécanismes complémentaires sont responsables de la coagulation du latex. Dans le premier, les lutoïdes libèrent des cations et des protéines neutralisant les charges négatives des particules de caoutchouc et dans le deuxième, l'hévéine se lie, *via* le N-acétyl-D-glucosamine, à un récepteur glycoprotéique localisé à la surface des particules de caoutchouc conduisant à la formation de ponts et à la

coagulation du latex (Gidrol et al., 1994). La blessure et l'application d'hormones tels que l'acide abscissique et l'éthylène entraînent une augmentation de la quantité d'ARN messagers d'hévéine dans les feuilles, les tiges et le latex (Broekaert et al., 1990).

Le stress oxydatif est donc à l'origine des problèmes liés à l'écoulement du latex. Il se traduit par un déséquilibre entre les AOS et les systèmes de détoxification présents dans la cellule. Le singulet d'oxygène ($^1\text{O}_2$), l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^\bullet) sont responsables du stress oxydatif (Scandalios, 2005) (figure 6). En général, il existe plusieurs sources potentielles d'AOS dans les plantes (Mittler, 2002) associées, entre autres, au fonctionnement cellulaire lors de la photosynthèse et de la respiration. En condition normale, la production d'AOS est faible, mais de nombreux stress modifiant l'homéostasie cellulaire vont conduire à une augmentation de cette production (Foyer and Noctor, 2005). C'est le cas du stress hydrique, salin, lumineux, du choc de température, des métaux lourds, des radiations (UV), de la pollution atmosphérique, du stress mécanique, du manque de nutriment et de l'attaque de pathogènes (Dat et al., 2000; Noctor and Foyer, 1998). Ces AOS, principalement l' H_2O_2 , peuvent jouer un rôle de molécule signal (Wojtaszek, 1997; Foyer and Noctor, 2005; Neill et al., 2002) mais l'augmentation de leur concentration, pendant ces stress, entraîne de nombreux dommages à la cellule tels que des peroxydations de composés des membranes, la dégradation de polysaccharides, la dénaturation des enzymes et des lésions dans l'ADN (tableau 1) (Scandalios, 2005).

Pour protéger la cellule contre le stress oxydatif, la plante possède un **système de détoxification** très efficace (figure 7) qui peut être divisé en trois groupes : le groupe des **enzymes antioxydantes**, les **antioxydants liposolubles** associés aux membranes (l' α -tocophérol, β -carotènes et l'ubiquinone) et enfin les **antioxydants solubles** dans l'eau (le glutathion et ascorbate) (Mittler, 2002; Scandalios, 2005). Les enzymes antioxydantes font partie d'un système de protection efficace et très actif (figure 8). Ces enzymes incluent la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), les peroxydases et les enzymes du cycle glutathion/ascorbate. La SOD (Alscher et al., 2002) catalyse la dismutation de deux anions superoxydes et entraîne la formation de H_2O_2 et d' O_2 . Il existe plusieurs isoenzymes qui diffèrent, par leur localisation et leurs métaux catalytiques, la MnSOD dans les mitochondries, la FeSOD dans les chloroplastes et la CuZnSOD dans le cytosol et les chloroplastes (Alscher et al., 2002). La CAT dégrade le H_2O_2 en H_2O et O_2 . Les peroxydases oxydent un substrat

organique (RH₂) avec H₂O₂ produisant un substrat oxydé et de l'eau. Le cycle ascorbate/glutathion comporte plusieurs enzymes notamment l'ascorbate peroxydase (APX) qui va capturer l'H₂O₂. Ce cycle permet la régénération de l'ascorbate et du glutathion oxydé qui est l'accepteur final. Par ailleurs, la voie de biosynthèse du glutathion est bien connue chez les plantes et se fait en deux étapes par l'ajout de trois acides aminés, la première réaction étant catalysée par la glutamyl-cystéine ligase (GCL) (Jez et al., 2004), dont deux isoformes ont été récemment isolés au laboratoire.

Face à différents stress, ces enzymes sont connues pour réagir soit au niveau de l'expression de leur gène, soit au niveau de l'activité enzymatique. Ainsi, chez le blé, une augmentation de l'expression de la *MnSOD*, et une diminution de l'expression du gène codant la *CAT* ont été observée en réponse à un stress de basses températures (Baek and Skinner, 2006). On observe une augmentation de l'activité enzymatique des APX lors d'un stress provoqué par la chaleur ou l'intensité lumineuse excessive ainsi que par un traitement au méthyl viologène ou au peroxyde d'hydrogène chez *Nicotiana tabacum* et chez *Cucumis sativus* (Gechev et al., 2003; Song et al., 2005). Chez le tabac, une baisse de la température entraîne une baisse de l'activité de la *CAT* (Gechev et al., 2003). Enfin, l'activité des enzymes varie en fonction de l'organe de la plante. Ainsi en condition de stress salin, on observe un comportement antagoniste, de l'activité des enzymes détoxifiantes, entre les feuilles et les racines de *Calendula officinalis* : une diminution de l'activité de la *SOD* dans les feuilles mais une augmentation dans les racines et inversement pour la *CAT*, alors que, l'activité de l'APX est augmentée dans les deux organes (Chaparzadeh et al., 2004). Conscient que les régulations post-transcriptionnelles sont importantes et qu'une augmentation de l'expression d'un gène ne signifie pas automatiquement une augmentation de l'activité enzymatique, une étude de l'activité des enzymes détoxifiantes et de la quantité d'antioxydant sera menée en parallèle (F.Tali, 2006). Le rôle physiologique du (des) gène(s) candidat(s) devra être validé par l'obtention de plants d'hévéa transgéniques sur-exprimants et sous-exprimants ce ou ces gènes ; des études ayant montré, chez d'autres plantes, que la sur-expression de certains de ces gènes entraîne une meilleure tolérance au stress oxydatif (Allen et al., 1997). Ainsi, la tolérance au stress oxydatif est augmentée chez le tabac, par la sur-expression de la *FeSOD* et de la *CuZnSOD* (Gupta et al., 1993; Van Camp et al., 1996), Le plant de tabac sur-exprimant la *CuZnSOD* (Gupta et al., 1993) et *Medicago* sur-exprimant la *MnSOD* (McKersie et al., 1993) présentent une meilleure tolérance au froid. On observe également une meilleure tolérance au stress hydrique chez le riz sur-exprimant la *MnSOD* (Wang et al., 2005)

Au début de mon stage, trois génotypes contrastés (PB260, PB217 et RRIM600) devaient être étudiés, mais l'arrivée tardive du matériel n'a permis l'étude que d'un seul génotype, PB260. De même, l'expression devaient être analysée dans les feuilles et les écorces mais devant la lourdeur du travail, seules les feuilles ont été choisies. L'objectif de ce travail étant l'étude de l'expression des gènes codant des enzymes antioxydantes en réponse au stress, les jeunes plants greffés ont subi des traitements extrêmes susceptibles de provoquer un stress oxydatif. La photosynthèse étant une source d'AOS, l'étude du cycle circadien semble indispensable avant d'appliquer les différents traitements : stress lumineux, hydrique (sécheresse et inondation), froid, éthylénique et blessure. Les gènes codant les enzymes détoxifiantes (séquencés chez l'hévéa), ont été choisis pour l'étude de la réponse au niveau transcriptionnel : deux *SOD*, la *CAT*, deux *APX* ainsi que deux *GCL* impliqués dans la synthèse du glutathion. L'expression de ces gènes a été analysée par RT-PCR semi-quantitative qui consiste en une coamplification d'un gène cible et d'un gène qui servira de contrôle interne. Certes de nombreux gènes peuvent servir de contrôle interne, cependant seul celui de l'actine a été séquencé chez l'hévéa limitant ainsi le choix.

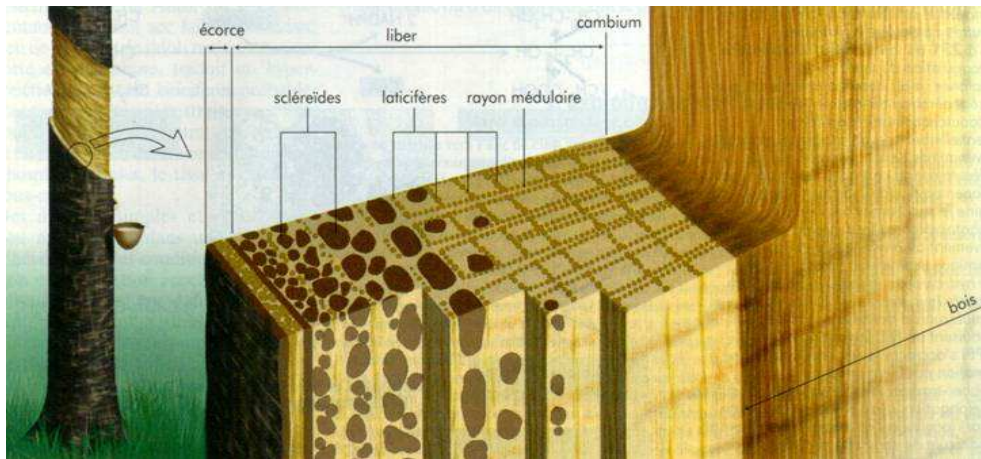


Figure 1 : Schéma d'une coupe d'un tronc d'hévéa.

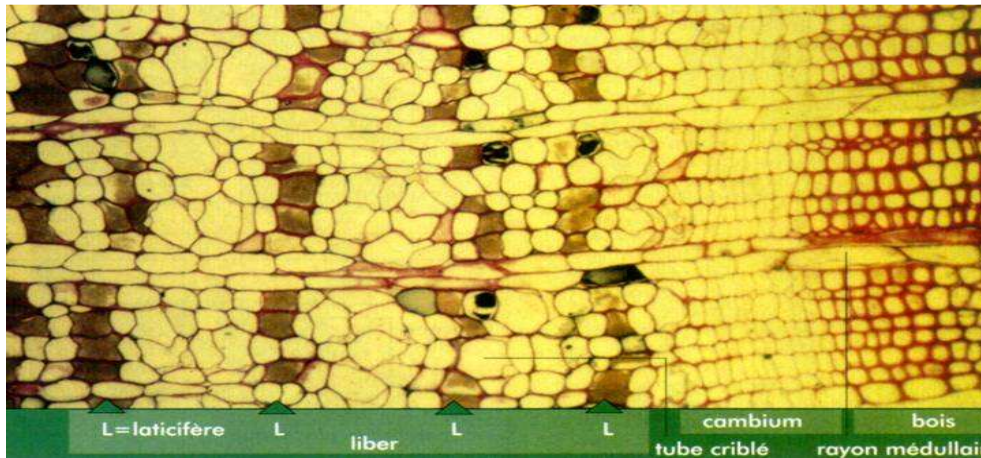


Figure 2 : Coupe transversale au microscope d'un jeune tronc : le cambium, méristème secondaire responsable de la croissance en épaisseur, donne naissance au bois vers l'intérieur et au liber vers l'extérieur, au sein duquel les laticifères se différencient.

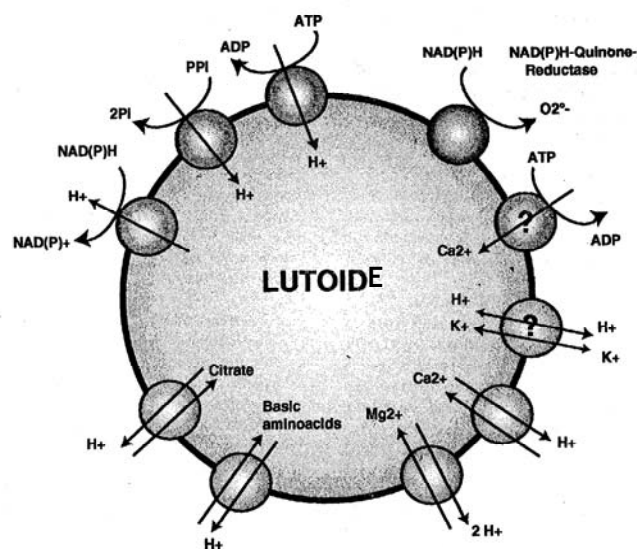


Figure 3 : Schéma d'un lutoïde : organe présent dans le latex. A sa surface se trouvent de nombreuses enzymes, pompes à protons et transporteurs actifs antiports

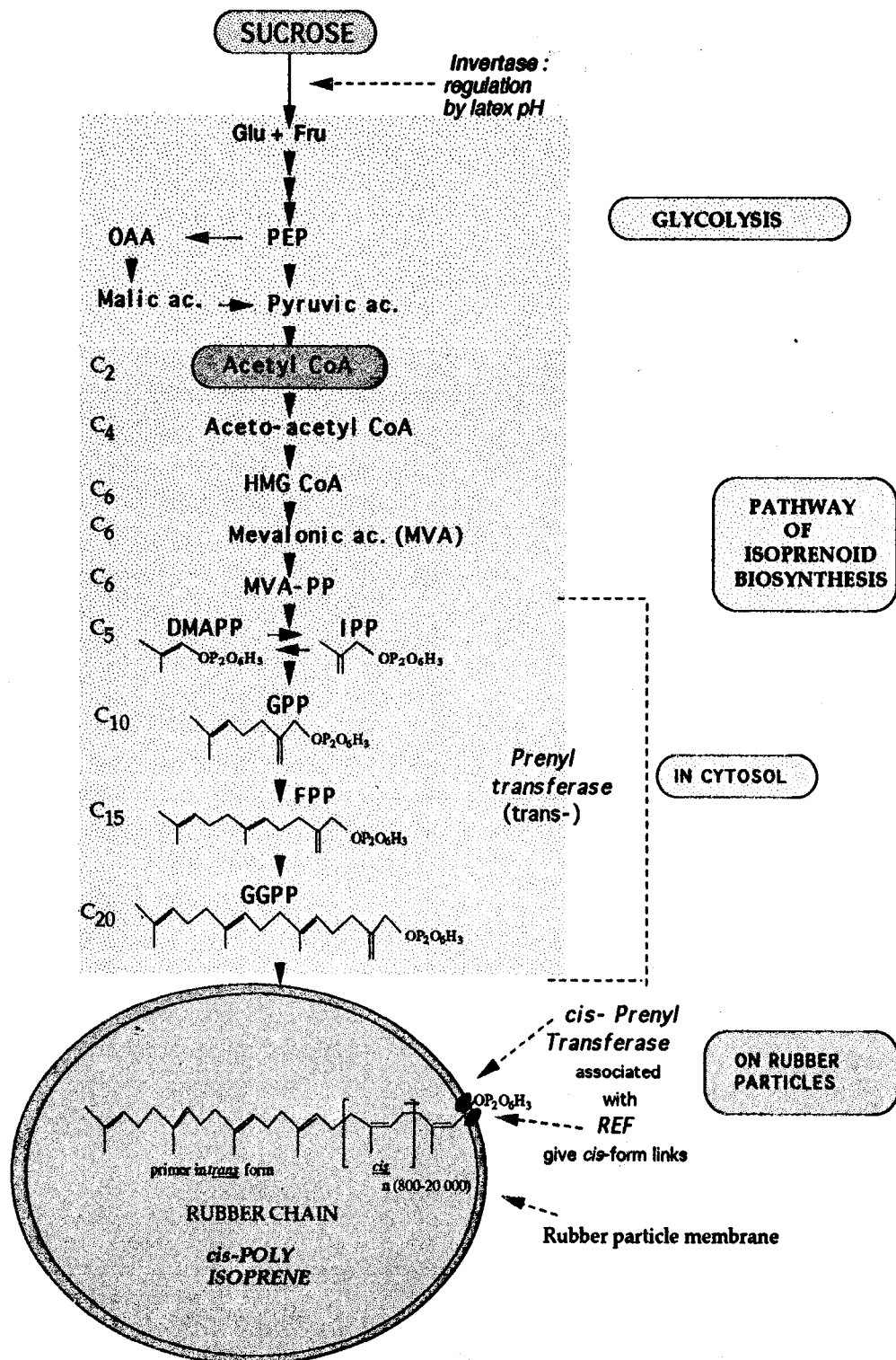


Figure 4 : Synthèse du caoutchouc naturel (*cis*-polyisoprène).
(D'après D'Auzac et al, 1997)

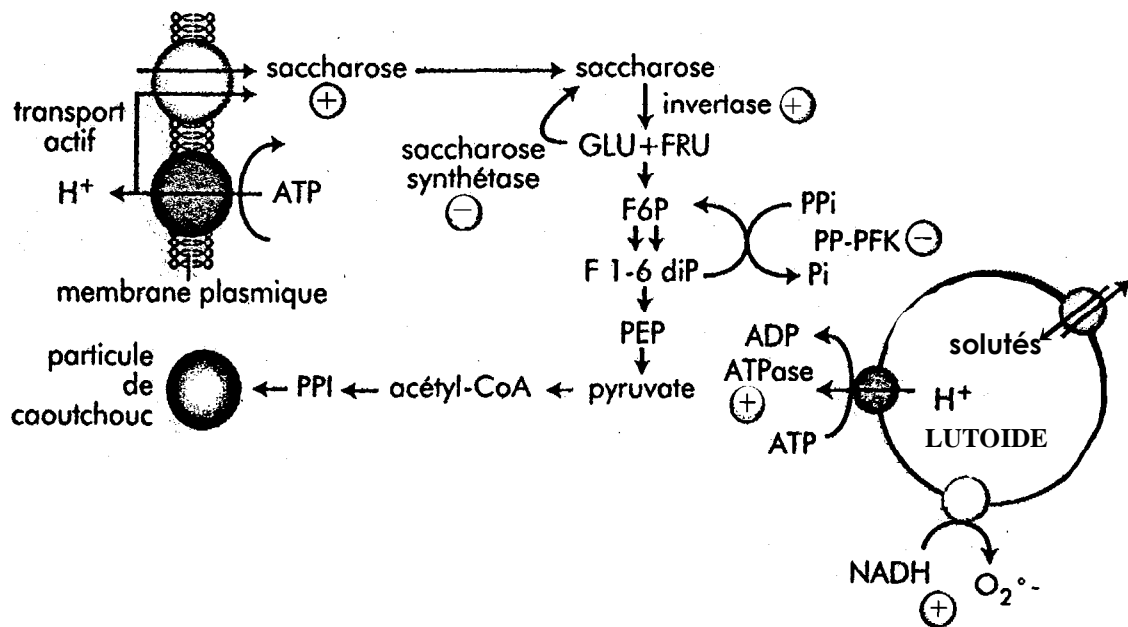


Figure 5 : Mécanisme liés à la stimulation éthylénique.

L'éthylène active des enzymes tels que l'invertase, ATPase de la membrane des lutoïdes et en inhibe d'autres comme la pyrophosphofructokinase (PP-PFK).

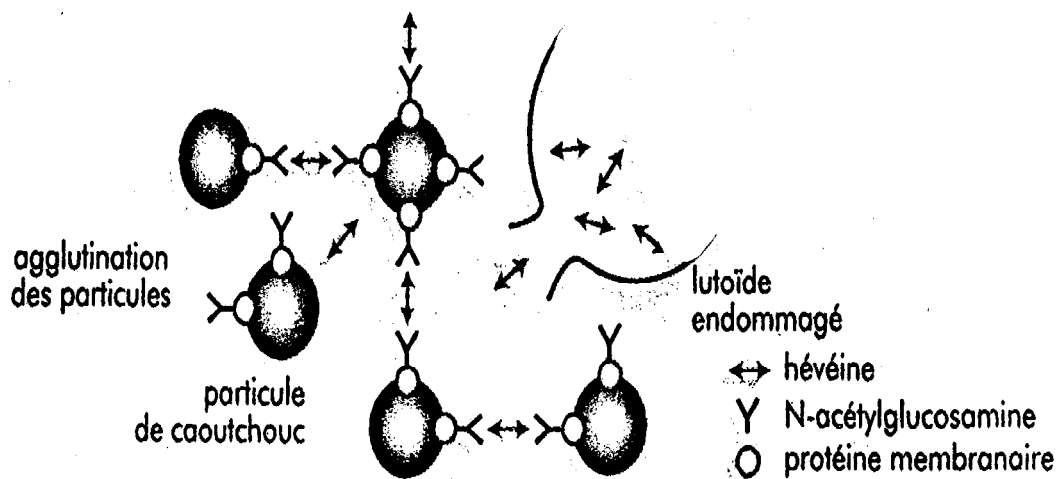


Figure 6 : Coagulation des particules de caoutchouc.

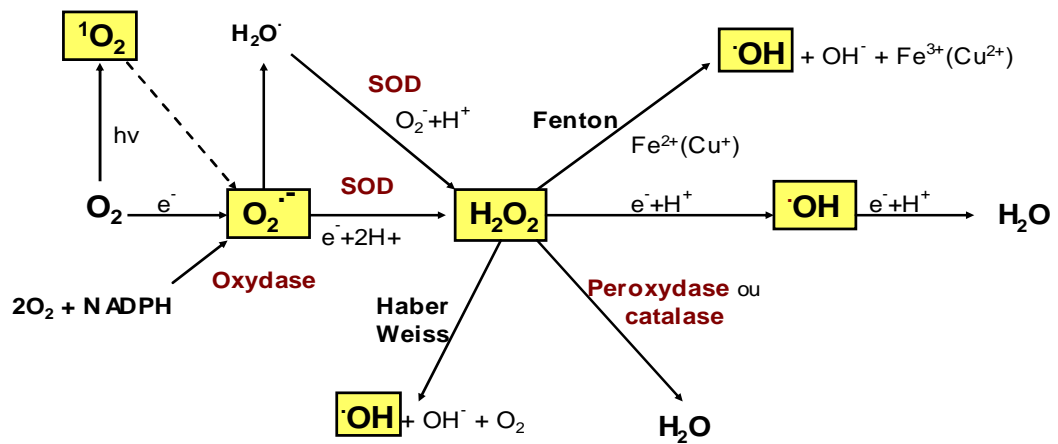


Figure 6 : Voie de synthèse des espèces activées d'oxygène (AOS).
 1O_2 : singulet d'oxygène, $O_2^{\cdot-}$: anion superoxyde, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, $\cdot OH$: radical hydroxyl, SOD : superoxyde dismutase.

Tableau 1 : Exemple de dommages causés par les AOS

Oxydations des lipides	<ul style="list-style-type: none"> • Désorganisation membranaire et mort cellulaire suite à des modifications des acides gras de la bicouche lipidique • Dans la nourriture, rancissement et développement des mauvaises odeurs
Oxydations des protéines	<ul style="list-style-type: none"> • Modifications d'acides aminés sensibles aux AOS • Fragmentation de la chaîne peptidique • Charge électrique altérée • Sensibilité accrue à la protéolyse • Destruction de la fonction enzymatique par oxydation des hèmes ferriques par $O_2^{\cdot-}$
Oxydations de l'ADN	<ul style="list-style-type: none"> • Délétions, mutation, translocations • Dégradation des bases, rupture des brins Liaison entre l'ADN et des protéines

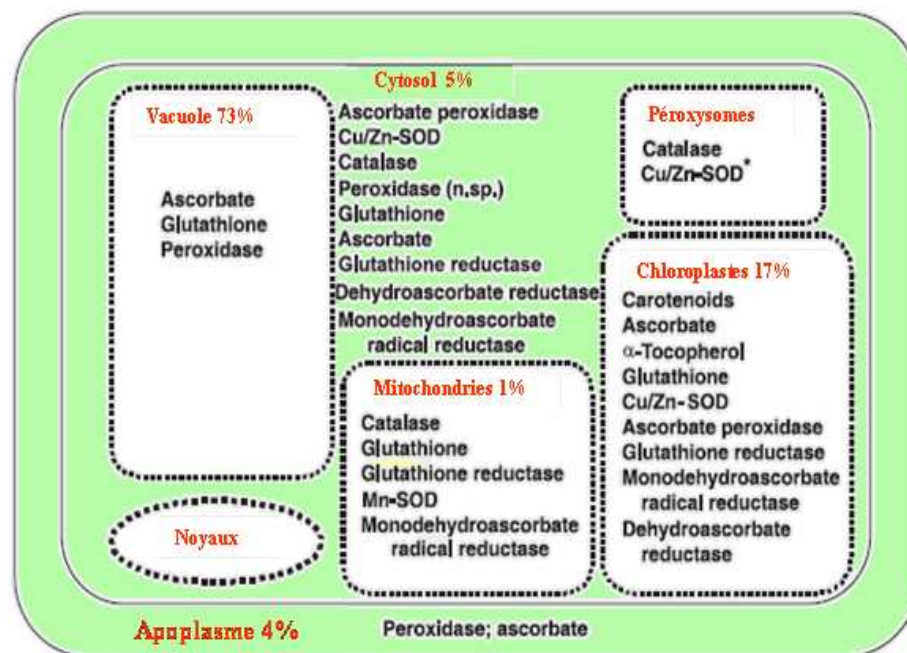


Figure 7 : Localisation et proportion des systèmes de détoxication dans la cellule.

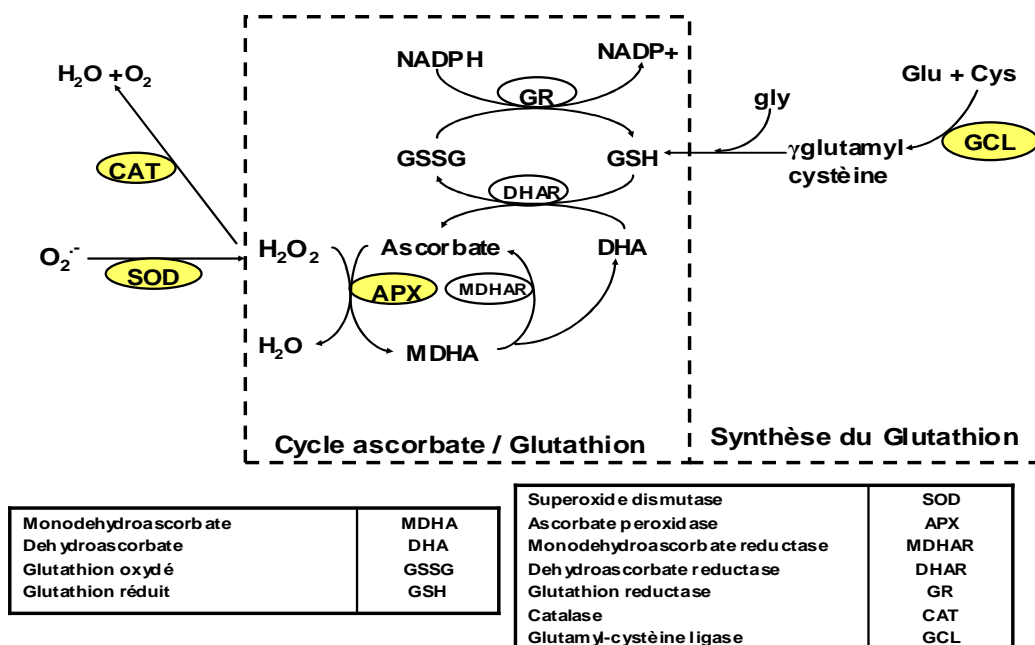


Figure 8 : Liste des enzymes impliquées dans le cycles ascorbate/ glutathion et dans la biosynthèse du glutathion

II Résultats

Dans le but d'identifier des gènes marqueurs d'un stress particulier, le travail présenté ici porte sur la recherche d'expression différentielle de sept gènes en réponse à des traitements hormonaux et abiotiques. Nous avons choisi d'appliquer plusieurs traitements connus pour engendrer un stress oxydatif comme le froid, la lumière, l'inondation, la sécheresse, la blessure et le traitement éthylénique, qui ne sont qu'une partie des stress que subit l'arbre en exploitation. Ainsi, dans un premier temps, le nombre de traitements a été privilégié par rapport aux nombres de répétitions biologiques. En effet, pour chaque traitement, deux plants sont utilisés, un qui sert de référence, et l'autre qui est soumis au traitement. Des répétitions biologiques seront déterminées par la suite pour optimiser les résultats sur des stress choisis et pendant des durées choisies.

L'information importante attendue et obtenue est l'observation d'une expression différentielle des gènes choisis en réponse aux différents traitements.

1) Impact du cycle circadien sur l'expression de gènes

La photosynthèse est une des sources d'AOS. L'étude du cycle circadien permet d'observer l'évolution de l'expression des gènes au cours d'une journée. Les prélèvements de feuilles ont été effectués à trois moments précis de la journée : 8h, 12h et 16h. Ces prélèvements sont réalisés sur la même plante afin de limiter les variations inter-plantes.

Pour certains gènes (figure 10), l'activité transcriptionnelle est constante au cours de la journée, comme pour la *GCL chloroplastique*, la *CuZnSOD* et l'*APX2*. Pour la *CAT*, *APX1*, la *GCL cytosolique* et *MnSOD*, leurs expressions augmentent progressivement au cours de la journée. Pour la *MnSOD*, la *CAT* et l'*APX1*, l'augmentation de leur expression est faible entre 8h et 12h mais croît fortement entre 12h et 16h.

Afin d'éviter cette variation dans l'expression des gènes, due à l'intensité photosynthétique, tous les prélèvements pour les études suivantes, ont été effectués à la même heure (vers 12h). Les plants témoins, servant de référence, ont été prélevés en même temps que les plants stressés, afin de pouvoir normaliser les résultats en fonction du témoin correspondant limitant ainsi les effets du cycle circadien.

2) Expression de gènes en réponse à un stress lumineux

L'exposition du plant pendant 24 heures sous une lampe au mercure, a entraîné une augmentation du rayonnement photosynthétique actif (PAR), d'une valeur de 180 pour les plants non exposés à une valeur de 860 pour le plant stressé, ainsi qu'une hausse de la température jusqu'à 35°C (figure 11A) pendant la durée du traitement. Les feuilles, les plus proches de la lampe, présentaient une décoloration due probablement à l'excès de rayonnement et de température.

L'expression des gènes étudiés (figure 12) a été normalisée par rapport au niveau de l'expression de l'actine (gène de référence), puis par rapport au niveau de l'expression d'un plant qui n'a pas subi de stress. Cette représentation nous permet d'observer directement la variation de l'expression du gène, survenu chez le plant stressé. Le plant témoin a été utilisé, non seulement pour l'analyse du stress lumineux mais, aussi pour l'analyse de l'impact de l'inondation car ces traitements ont été réalisés en même temps.

La *GCL chloroplastique* et l'*APX1* présente une expression constitutive. Il est difficile de conclure à une réelle induction de l'expression de gènes de la *GCL cytosolique*, de la *MnSOD* et de l'*APX2*. La *CAT* présente une légère augmentation de son expression. Un gène se distingue, il s'agit de la *CuZnSOD* dont l'activité transcriptionnelle est fortement augmentée par rapport au témoin.

3) Expression de gènes en réponse à un stress froid

Au cours de ce traitement, le plant d'hévéa a subi une baisse de température jusqu'à 8°C, même si cette baisse n'a été que de courte durée (figure 11B) et que le réchauffement s'est fait de manière très rapide entre 8h et 12h. Aucun phénotype visuel n'a été repéré.

En ce qui concerne l'expression de gènes (figure 13), la *CuZnSOD*, la *MnSOD* et la *CAT* ne semblent pas présenter une augmentation significative des transcrits. En revanche, les deux *GCL*, ne présentent qu'une très légère augmentation de la quantité d'ARN messagers, alors que l'induction de l'expression pour les deux *APX* est plus forte.

4) Expression de gènes en réponse à un stress hydrique : la sécheresse

D'une manière exceptionnelle, nous avons utilisé un plant issu de graine d'une lignée de PB260, pour appliquer le stress hydrique. Ce plant a subi un arrêt d'arrosage pendant 9

semaines. Au niveau du phénotype, on remarque un ralentissement très net de la croissance. En effet, les deux plants, témoin et stressé, possédaient une seule unité de croissance avant l'application du stress. Après 9 semaines, le plant non stressé présente trois unités de croissance alors que le plant stressé ne présente qu'une unité de croissance (figure 14). Afin de constater l'intensité du stress, une quantification de la teneur en eau et du potentiel hydrique a été réalisée chez les deux plants. La teneur en eau traduit la quantité d'eau présente dans les tissus. Le plant témoin présente une teneur en eau moyenne dans les feuilles de 69,5% contre 63,8% pour le plant stressé. Le potentiel hydrique, quant à lui, traduit la disponibilité en eau des tissus. Le plant témoin présente un potentiel hydrique moyen de -0.9 MPa alors que le plant stressé présente un potentiel hydrique moyen de -1.75 MPa. La diminution de la teneur en eau des feuilles montre bien que la plante est en condition de stress hydrique, ce que confirme la forte diminution de son potentiel hydrique et l'arrêt de croissance.

En ce qui concerne l'expression de gène (figure 15), la *GCL chloroplastique*, ne présente pas une augmentation significative de transcrit. L'expression de la *GCL cytosolique* est légèrement induite. Quatre gènes présentent une expression légèrement inhibée, il s'agit de la *MnSOD*, de la *CAT* et des deux *APX*. Une fois de plus, le gène codant la *CuZnSOD* présente un profil intéressant. L'expression de ce gène est fortement augmentée en réponse à un stress hydrique.

5) Expression de gènes en réponse à un excès d'eau

Le plant a subi une immersion jusqu'au point de greffe pendant trois jours. Aucune modification n'est visible au niveau de la plante.

Au niveau de l'expression des gènes (figure 16), on observe trois profils. Ainsi, trois gènes présentent une expression constitutive : les deux *SOD* et la *GCL cytosolique*. Par contre la *GCL chloroplastique* et les deux *APX* ont une expression inhibée par l'application du traitement, visualisée par une diminution de la quantité de transcrit. Enfin, l'expression de la *CAT* est légèrement stimulée par le traitement.

6) Expression de gènes en réponse à un traitement éthylène

Les plants ont été traités avec 1ppm d'éthylène dans un caisson hermétique selon une cinétique allant de 1 heure à 24 heures. Le plant utilisé comme témoin pour le traitement à

l'éthylène est également placé dans le caisson. Cette manœuvre permet d'éliminer l'impact du caisson lors de la comparaison des deux plants (témoin et stressé). Chaque point de la cinétique représente l'expression des gènes à partir des ARN messagers issus d'un plant.

L'expression de quatre gènes a été étudiée à partir de ces échantillons (figure 17). Les deux *GCL* présentent une forte augmentation du nombre de transcrits dès la première heure de traitement. Toutefois, la *GCL chloroplastique* présente une expression maximum après une heure de traitement alors que la *GCL cytosolique* présente une expression maximum après 4 heures de traitement. Après ce pic, l'expression diminue progressivement pour la *GCL chloroplastique*, alors que le profil d'expression de la *GCL cytosolique* présente un second pic après 24 heures de traitement suite à une diminution après 8 heures de traitement. L'expression de la *CuZnSOD* est induite dès une heure de traitement puis diminue progressivement. Enfin, l'expression de la *MnSOD* est constante.

Ces données obtenues à partir d'un seul plant d'hévéa, limite de fait, la portée et la validation statistique de ces résultats. Une répétition biologique (sur un nouveau plant) a été effectuée avec 4 heures de traitement éthylénique. En ne tenant compte que de la deuxième répétition biologique, tous les gènes, à l'exception de la *CAT*, présentent une induction de leur expression (figure 18 A et B). Cette induction est variable suivant les gènes, l'expression de la *GCL cytosolique* étant la plus élevée.

L'ensemble des résultats des deux répétitions biologiques (figure 18A) permet de mieux analyser les résultats, et d'évaluer leur reproductibilité. On observe alors pour les deux *GCL* et la *CuZnSOD*, une bonne reproductibilité des résultats, aux vues des petites barres d'erreur. En revanche, la barre d'erreur étant plus grande pour les résultats d'expression de *MnSOD*, la conclusion est donc incertaine.

7) Expression de gènes en réponse à une blessure

Les plants ont été blessés par des entailles effectuées au scalpel sur la tige et en écrasant les feuilles à l'aide d'une pince crantée (figure 19). On a comparé un plant blessé avec un plant témoin suivant une cinétique allant de 15 minutes à 24 heures, chaque temps représentant un plant.

L'expression des gènes est induite très précocément (figure 20), dès 15 minutes de traitement. Cependant, plusieurs profils d'expression se dessinent, les gènes répondant différemment à la blessure. Tout d'abord, la *GCL chloroplastique*, l'*APX2* et la *CAT* présentent le même profil d'expression. L'expression de ces gènes est induite très

précocement (15 minutes pour la *GCL chloroplastique* et pour l'*APX2*, et 1 heure pour la *CAT*) puis on observe une diminution progressive de la quantité d'ARN messagers. Ensuite, la *GCL cytosolique*, la *MnSOD* et l'*APX1* présentent une augmentation de l'expression avec un maximum se situant à 1 heure, cependant, un second pic apparaît après 8 heures de traitement pour l'*APX1* et la *MnSOD* et après 24 heures de traitement pour la *GCL chloroplastique*. Enfin, la *CuZnSOD* présente un profil d'expression différent, l'induction de l'expression de ce gène étant transitoire. On observe une augmentation de la quantité d'ARN messagers jusqu'à une heure après le traitement puis l'expression revient à un niveau presque comparable de celui du témoin.

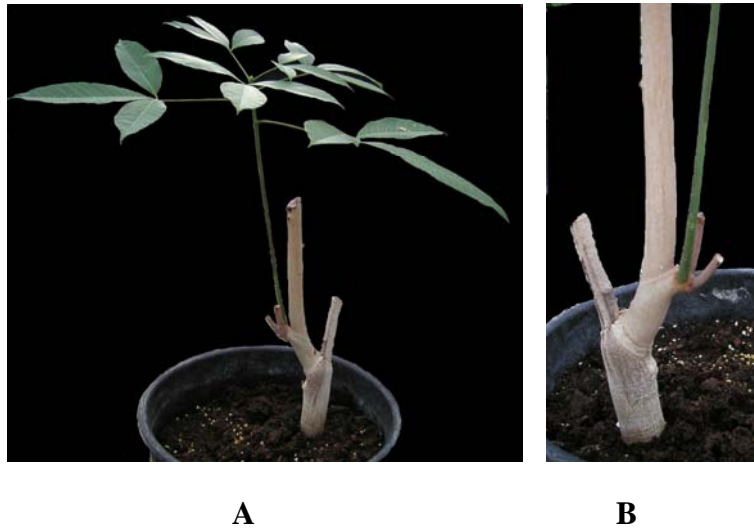


Figure 9 : Plant d'*Hevea Brasiliensis* PB260 greffé comportant une unité de croissance (A), grossissement sur le point de greffe (B).

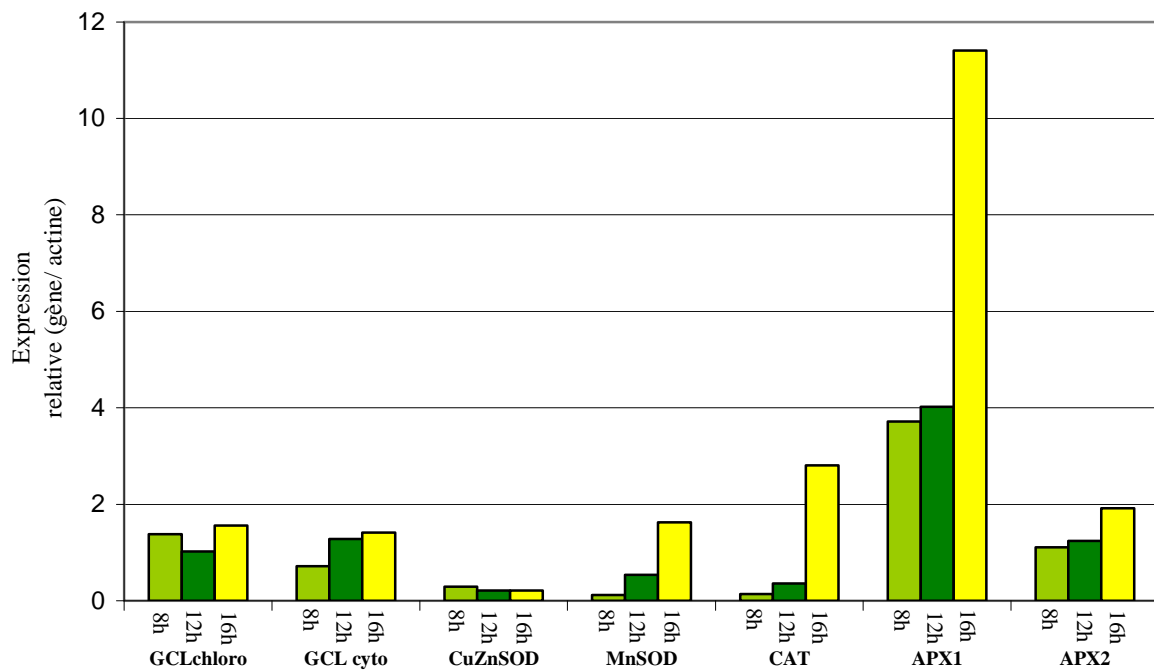


Figure 10 : Effet du cycle circadien sur l'expression des gènes : l'analyse a été faite sur les feuilles matures prélevées sur le même plant d'hévéa à trois temps de la journée : 8h, 12h et 16h. Le graphique est fait à partir de plusieurs photos analysées par le logiciel ImageQuant. *GCL chloro* : glutamyl-cystéine ligase chloroplastique, *GCLcyto* : glutamyl-cystéine ligase cytosolique, *SOD* : superoxyde dismutase, *CAT* : catalase, *APX* : ascorbate peroxydase.

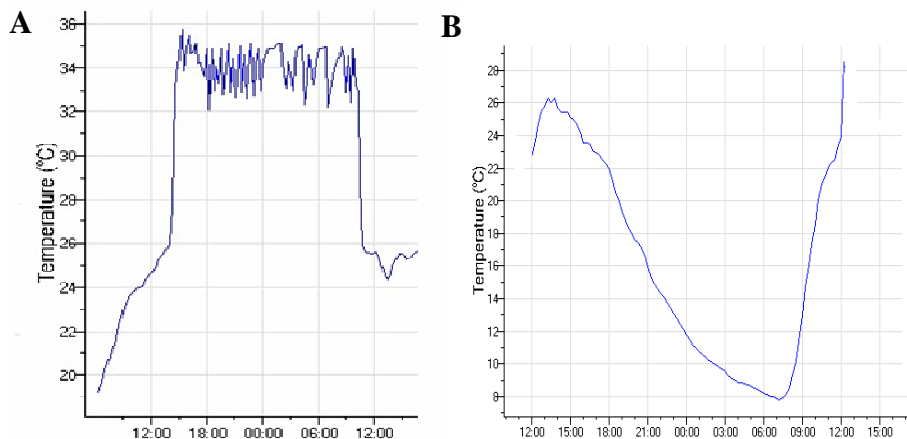


Figure 11: Courbe de température. Conditions de température subit par les plants soumis au stress lumière (A) et au stress froid (B).

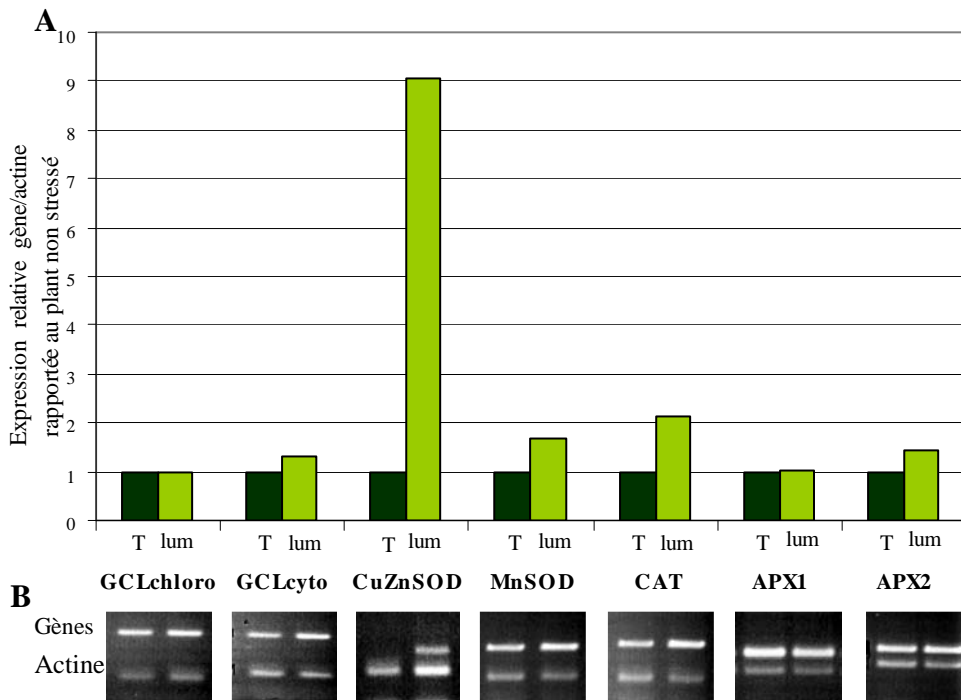


Figure 12 : Effet d'un stress lumineux sur l'expression des gènes. Photo de gel de migration après RT-PCR semi-quantitative, représentant les amplifications des deux ADNcs (B). Graphique fait à partir de données issues d'analyse par le logiciel ImageQuant des gels de migration. *GCL chloro* : glutamyl-cystéine ligase chloroplastique, *GCLcyto* : glutamyl-cystéine ligase cytosolique, *SOD* : superoxyde dismutase, *CAT* : catalase, *APX* : ascorbate peroxydase. (A)

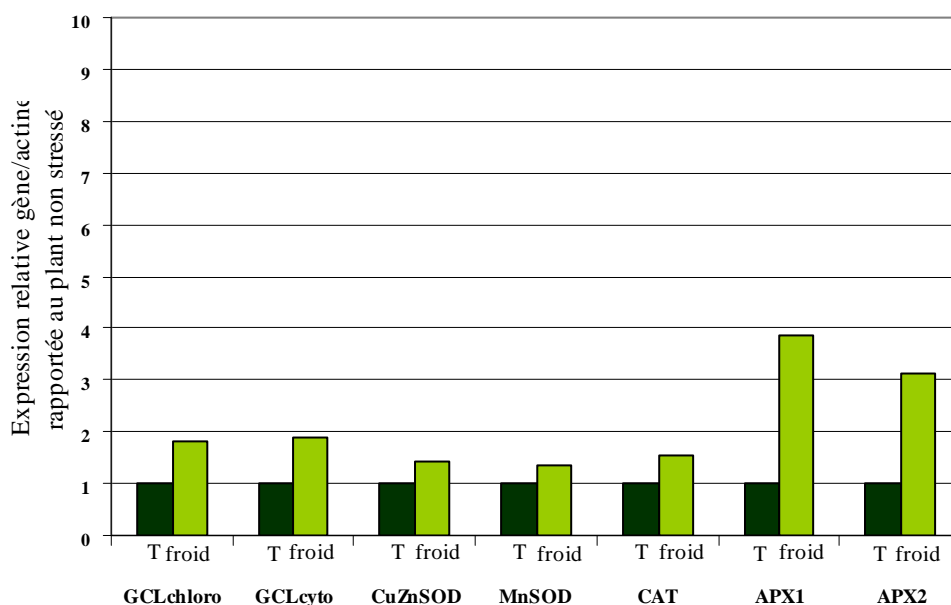


Figure 13 : Effet d'un stress froid sur l'expression des gènes. Graphique fait à partir de données issues d'analyse des gels de migration après RT-PCR semi-quantitative, par le logiciel ImageQuant, les valeurs sont rapporté à l'actine puis aux valeurs d'expression du plant non stressé. *GCL chloro* : glutamyl-cystéine ligase chloroplastique, *GCLcyto* : glutamyl-cystéine ligase cytosolique, *SOD* : superoxyde dismutase, *CAT* : catalase, *APX* : ascorbate peroxydase.



Figure 14 : Effet d'un stress hydrique sur la croissance

Les deux plants avaient une unité de croissance avant l'application du stress. Après les 9 semaines sans arrosage, le plant non stressé (A) présente 3 unités de croissance, alors que le plant stressé (B) en présente qu'une.

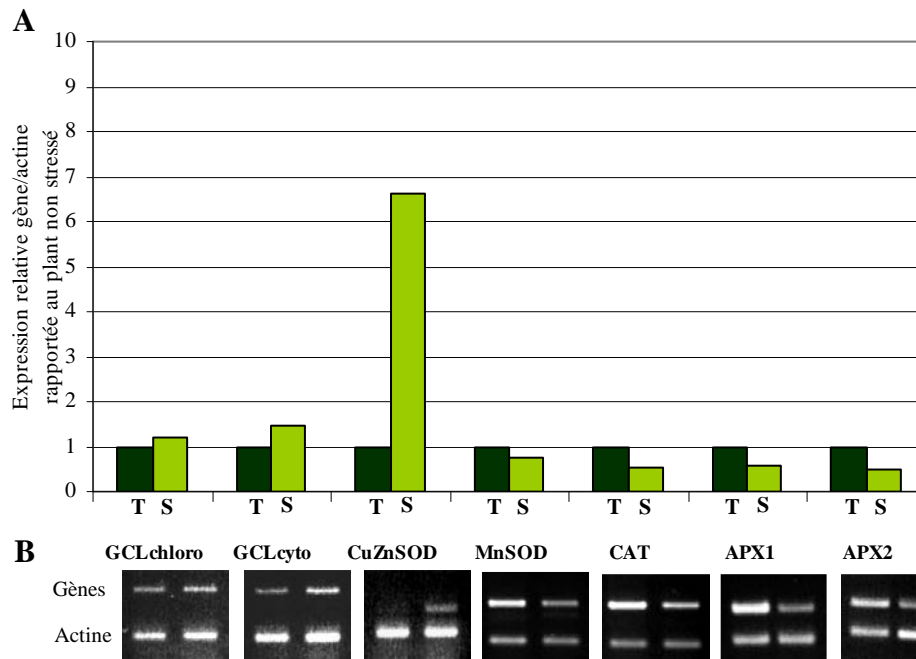


Figure 15 :

Effet de la sécheresse sur l'expression des gènes. Les plants ont été privés d'eau pendant 9 semaines. (T : témoin, S : sécheresse) Photo de gel de migration après RT-PCR semi-quantitative, représentant les amplifications des deux ADNcs (B).

Graphique fait à partir de données issues d'analyse par le logiciel ImageQuant des gels de migration. (A) *GCL chloro* : glutamyl-cystéine ligase chloroplastique, *GCLcyto* : glutamyl-cystéine ligase cytosolique, *SOD* : superoxyde dismutase, *CAT* : catalase, *APX* : ascorbate peroxydase.

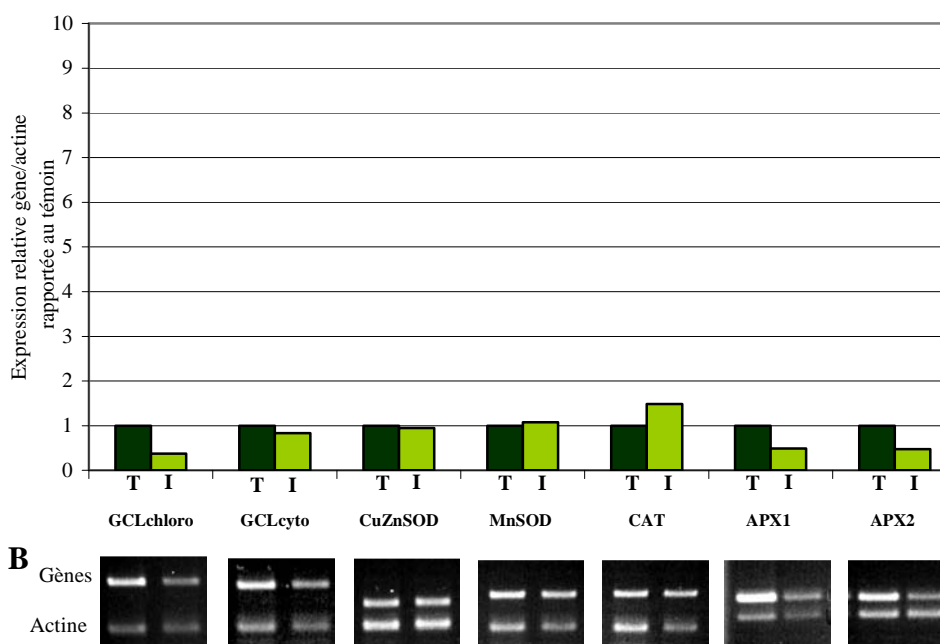


Figure 16 :

Effet de l'inondation sur l'expression des gènes. Le plant est immergé jusqu'au point de greffe pendant 3 jours.

(T : témoin, I : inondation) Photo de gel de migration après RT-PCR semi-quantitative, représentant les amplifications des deux ADNcs (B).

Graphique fait à partir de données issues d'analyse par le logiciel ImaQuant des gels de migration. (A) *GCL chloro* : glutamyl-cystéine ligase chloroplastique, *GCLcyto* : glutamyl-cystéine ligase cytosolique, *SOD* : superoxyde dismutase, *CAT* : catalase, *APX* : ascorbate peroxydase.

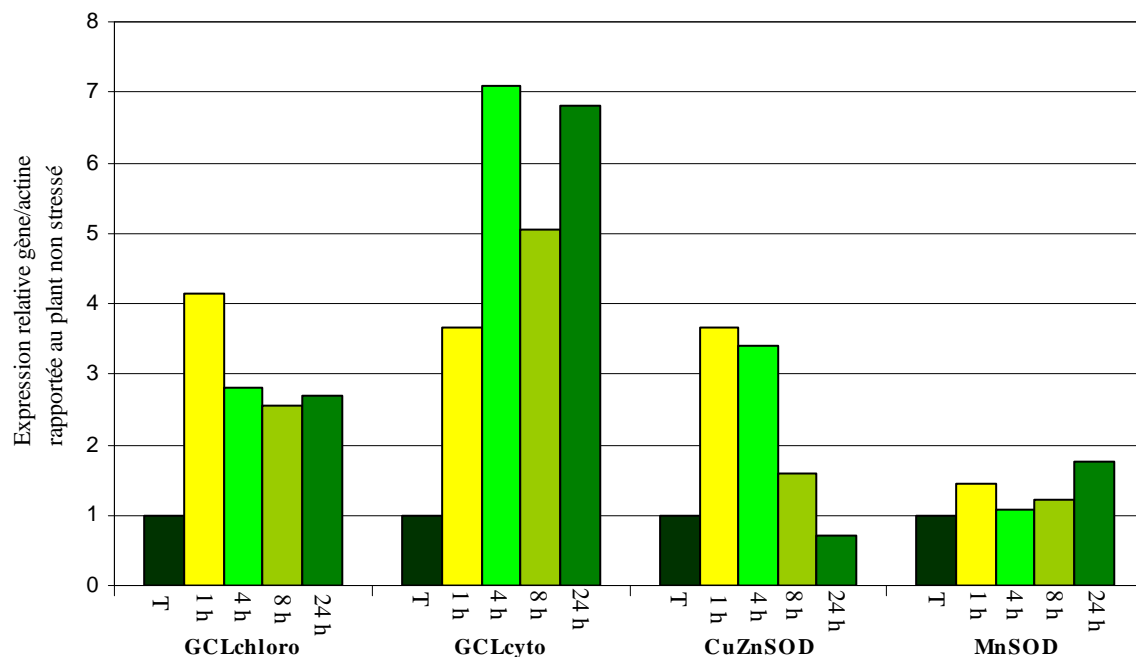


Figure 17 : Expression des gènes en réponse à un traitement éthylénique. Analyse par RT-PCR semi-quantitative, de l'expression de gènes codant pour des enzymes antioxydantes, sur les feuilles d'hévéa traités sur une durée allant de 1heure (1h) à 24 heures (24h). *GCL chloro* : glutamyl-cystéine ligase chloroplastique, *GCLcyto* : glutamyl-cystéine ligase cytosolique, *SOD* : superoxyde dismutase, *CAT* : catalase, *APX* : ascorbate peroxydase.

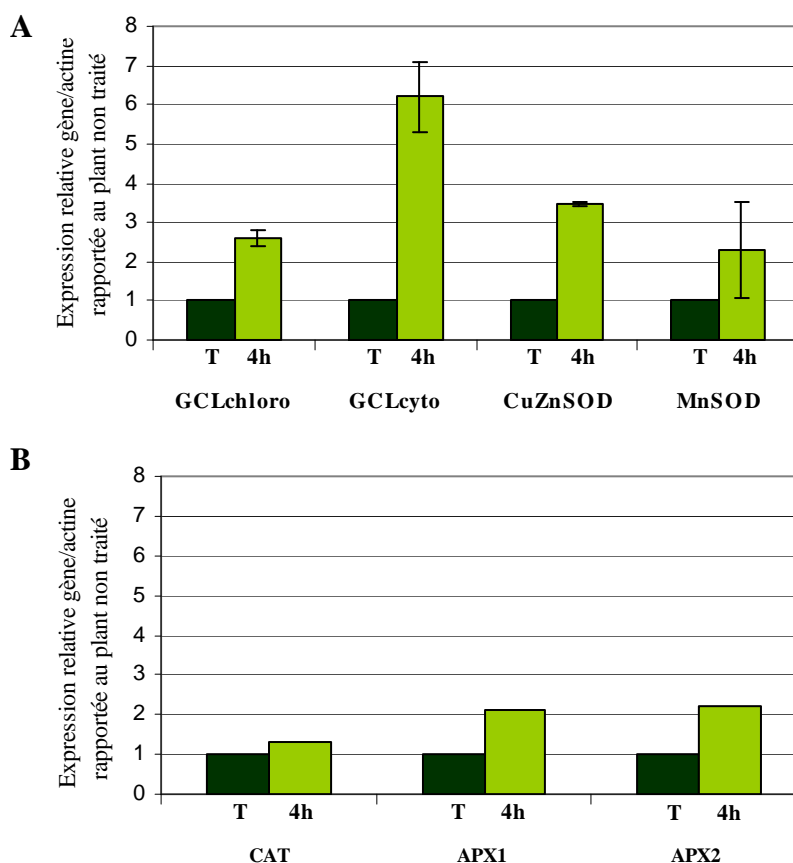


Figure 18 : Expression de gène en réponse à un traitement éthylénique.

Analyse de l'expression des gènes sur les feuilles d'hévéa soumis à un traitement à l'éthylène pendant 4 heures. (T : témoin)

(A) : analyse de deux répétitions biologiques (plants différents, saisons différentes).

(B) : analyse sur un plant d'hévéa.

GCL chloro : glutamyl-cystéine ligase chloroplastique, *GCLcyto* : glutamyl-cystéine ligase cytosolique, *SOD* : superoxyde dismutase, *CAT* : catalase, *APX* : ascorbate peroxydase.

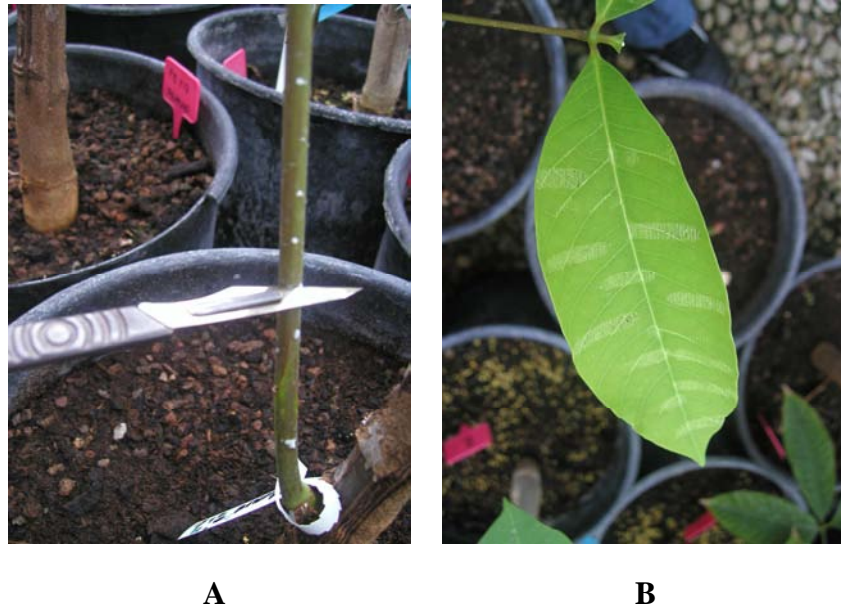


Figure 19 : Blessures effectuées au niveau de la tige au scalpel (A) et au niveau des feuilles avec une pince crantée (B), sur un plant d'hévéa PB260.

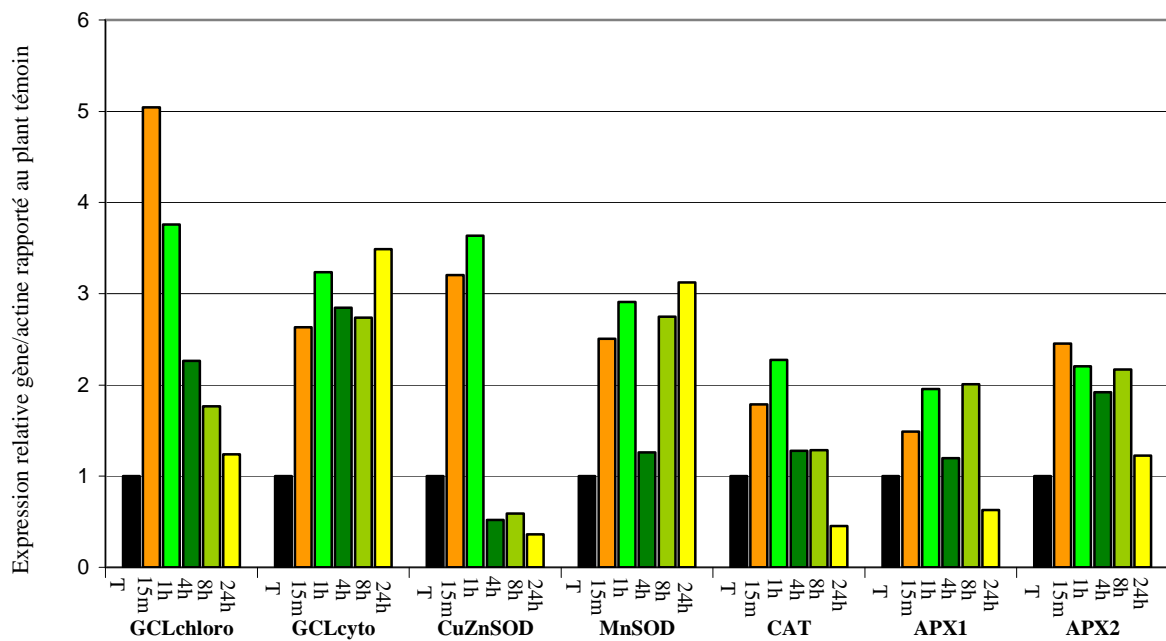


Figure 20 : Expression des gènes en réponse à la blessure.

Analyse par RT-PCR semi-quantitative, sur les feuilles d'hévéa, de l'expression de gènes codant pour des enzymes antioxydantes en réponse à la blessure selon une cinétique de 15 minutes (15min) à 24 heures (24h). *GCL chloro* : glutamyl-cystéine ligase chloroplastique, *GCLcyto* : glutamyl-cystéine ligase cytosolique, *SOD* : superoxyde dismutase, *CAT* : catalase, *APX* : ascorbate peroxydase.

III Discussion et conclusions

La productivité des hévéas est fortement corrélée à la vitesse d'écoulement du latex et à la régénération de celui-ci entre les deux saignées. Le stress oxydatif, engendré par les méthodes d'exploitation de l'arbre et visible par un déséquilibre entre les AOS et les systèmes de détoxification présents dans la cellule, est probablement à l'origine du syndrome de l'encoche sèche.

Dans ce contexte, il est donc important de mieux connaître la réponse au stress oxydatif, notamment au niveau transcriptionnel, des arbres en exploitation. Pour ce faire, la stratégie retenue par l'équipe est d'utiliser, pour des raisons évidentes d'accès au matériel végétal, des jeunes plants greffés en serre ainsi que d'étudier l'expression de sept gènes isolés chez l'hévéa et impliqués dans les systèmes de détoxification des AOS.

Ce travail a permis de cribler l'expression de ces gènes dans l'objectif de déterminer un ou plusieurs marqueurs de la réponse au stress oxydatif. Cette étude a également permis de mettre en évidence les stress les plus marquants dont l'étude sera approfondie avec des répétitions biologiques à des temps clefs.

En effet, en évaluant la régulation transcriptionnelle de ces gènes, en réponse à différents traitements extrêmes pouvant entraîner un stress oxydatif, on remarque une expression différentielle des gènes pour un stress donné, mais également une expression différentielle d'un gène donné en fonction des stress.

Dans un premier temps, l'effet du cycle circadien a été analysé car des AOS sont produites lors de la photosynthèse au niveau des chloroplastes. L'analyse de l'activité transcriptionnelle montre que certains gènes, comme la *CAT*, l'*APX1*, la *GCL cytosolique* et la *MnSOD*, présentent une augmentation de leurs expressions. Cependant les données biochimiques montrent une teneur en ascorbate (de l'ordre de 10µM/ g de matière fraîche) et en thiols (2µM/g de matière fraîche) constant au cours de la journée. Dans ce cas, les prélèvements étant effectués sur la même plante, l'effet additif de la blessure, lié aux prélèvements des feuilles a été envisagé. Cette hypothèse est écartée par l'analyse de l'expression des gènes en réponse à la blessure, car les deux *GCL*, qui semblent être de bons marqueurs de l'effet de la blessure, avec une augmentation forte de leurs expressions sur les

feuilles, présente ici une expression constante au cours de la journée. A ce stade, le moment de prélèvement a été fixé vers midi pour les autres stress.

Dans un second temps, plusieurs stress abiotiques ont été appliqués et, parmi les sept gènes analysés, la *CuZnSOD* montre un profil d'expression intéressant. En effet, lors de stress abiotiques forts tels que la sécheresse et la lumière, l'expression de ce gène est fortement stimulée. Ces traitements ont entraîné un stress oxydatif fort qui a probablement nécessité le fonctionnement des systèmes de détoxification des AOS. Cette hypothèse est confirmée par des données biochimiques effectuées sur ces mêmes plants. Par exemple, chez la plante soumise à un déficit hydrique fort, on observe une augmentation de la teneur en ascorbate (composé antioxydant) ainsi que de celle en thiols (agent réducteur dont fait partie le glutathion). Parallèlement à la diminution de l'expression des deux *APX* et de la *CAT* en réponse à la sécheresse, l'activité de ces enzymes diminue. Toutes ces informations laissent supposer une accumulation de H_2O_2 , car sa réduction en H_2O est moindre, tant par la diminution de l'activité des *APX* dans le cycle glutathion/ascorbate que par celle de la *CAT* dans les péroxysomes. De manière additive, l'augmentation de l'expression de la *CuZnSOD*, dont la protéine réduit l'anion superoxyde en H_2O_2 , pourrait s'accompagner d'une plus forte production d' H_2O_2 , si son activité enzymatique augmentait. Un dosage de l'activité SOD suffirait à valider cette hypothèse. Bien qu'une concentration très élevée en H_2O_2 peut être phyto-toxique, une faible concentration peut directement réguler, en tant que molécule signal, la mise en place des réponses physiologiques de la plante soumise à des stress abiotiques (Dat et al., 2000). En effet, il a été démontré que, chez *Arabidopsis* et le maïs, l'accumulation d' H_2O_2 s'accompagne d'une meilleure tolérance à un stress lumineux (Karpinski et al., 1999) et à un stress froid (Prasad et al., 1994).

En ce qui concerne le froid et l'inondation, on peut s'interroger sur l'intensité et la durée de l'application de ces stress. En effet, chaque plante possède une gamme de température unique et optimale pour leur croissance et leur développement. Les effets majeurs du froid se caractérisent par des dommages graves au niveau des membranes, liés à une déshydratation. Les AOS produites, en réponse au stress, renforcent ces dommages membranaires (Mahajan and Tuteja, 2005). La baisse de température (jusqu'à 8°C) n'a pas entraîné d'important changement dans l'expression des gènes, l'expression des deux *GCL* et des deux *APX* n'étant que faiblement induite. Cependant, au niveau biochimique, la teneur en ascorbate ainsi que l'activité enzymatique de la *CAT* et des *APX* diminuent légèrement, confirmant qu'il y a tout de même eu un ralentissement métabolique, sans effet sur la

transcription des gènes étudiés. Ainsi, soit la baisse de température n'était pas suffisante, soit cette baisse fut suffisante mais de trop courte durée compte tenu du réchauffement très rapide. Par conséquent, le stress appliqué n'étant pas assez fort, la production d'AOS ainsi que les dommages cellulaires engendrés par le froid restent limités. La même conclusion s'impose pour l'inondation. L'excès d'eau résulte en une réduction de l'oxygène au niveau des racines ce qui va réduire la respiration et limiter la disponibilité en nutriment (Mahajan and Tuteja, 2005). Une immersion de trois jours est probablement insuffisante pour entraîner une asphyxie racinaire et un stress oxydatif assez fort.

Deux traitements se rapprochent de stress subis par l'hévéa en cours d'exploitation. La blessure simule la saignée effectuée sur le tronc des arbres pour récolter le latex et le traitement à l'éthylène simule la stimulation effectuée par Ethrel®.

Les réponses à la blessure, au niveau transcriptionnel, sont très précoces, visibles dès 15 minutes après le traitement. L'expression de tous les gènes est augmentée, très fortement pour certains tels que les deux *GCL* ou transitoire comme pour la *CuZnSOD*. Parallèlement, on observe une baisse du pool d'ascorbate, mais une teneur en thiols et une activité enzymatique APX constants après 4 heures de traitement. Ces données laissent supposer que l'ascorbate est mal régénéré malgré une expression des *GCL*, participant à la biosynthèse d'un agent fortement réducteur qu'est le glutathion, très fortement augmentée. Le dosage des activités enzymatiques des *GCL* serait intéressant et permettrait de spécifier le facteur limitant de la régénération de l'ascorbate, la baisse de l'activité des *GCL* pouvant expliquer une diminution du pool de glutathion.

Quant au traitement éthylénique, il entraîne une mobilisation des systèmes de détoxification, visualisée par une augmentation de l'expression des deux *GCL*, des deux *SOD* et des deux *APX*. Par contre, les données biochimiques montrent des valeurs constantes des teneurs en ascorbate et en thiols après quatre heures de traitement à l'éthylène. La durée nécessaire à la transcription, la traduction et l'activation des enzymes, expliquerait ces taux constants des composés antioxydants. Bien que les temps choisis soient suffisants pour visualiser des changements dans la régulation transcriptionnelle des gènes étudiés, des temps de traitements plus longs seraient nécessaires pour visualiser des changements dans le dosage des composés antioxydants.

Enfin, parmi les gènes étudiés, différentes isoformes ont été sélectionnées et les profils d'expression sont différents. Ceci laisse supposer une réponse spécifique de chaque isoforme

liée à leur localisation cellulaire. En effet, les deux *SOD* ne présentent pas le même profil d'expression en réponse au stress lumineux et au déficit hydrique, la *CuZnSOD* étant localisée dans le cytosol ou dans les chloroplastes et la *MnSOD* se situant dans les mitochondries (Alscher et al., 2002). C'est le cas aussi pour les deux isoformes de la *GCL*, l'une chloroplastique, l'autre cytosolique. En ce qui concerne les deux *APX*, nous ne disposons que de séquences partielles qui ne nous permettent pas de prédire leur localisation. Il serait alors intéressant de prendre en compte la compartimentation cellulaire pour se focaliser sur des gènes spécifiquement exprimés dans les laticifères.

La *CuZnSOD* présente une réponse forte à l'application des traitements tels que la blessure, l'éthylène, la sécheresse et la lumière. Il a été montré que la sur-expression de gènes codant des enzymes antioxydantes tels que la *SOD* permettait d'augmenter la tolérance au stress oxydatif (Gupta et al., 1993; Van Camp et al., 1996). Dans cette perspective, la *CuZnSOD* se révèle être un bon candidat pour l'amélioration de la tolérance au stress oxydatif de l'hévéa par génie génétique limitant ainsi son impact sur la production de latex. Les constructions moléculaires sont d'ores et déjà réalisées.

La mise en place de répétitions biologiques est une priorité dans la suite de ce travail, principalement pour le traitement éthylénique et la blessure, qui sont directement mis en jeu lors de l'exploitation de l'hévéa. Des analyses antérieures montrent une très bonne reproductibilité des résultats pour l'expression des gènes *ACO* et *ACS* impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène (Montoro, communication personnelle). Une durée de traitement de 4 heures semble convenir pour observer une régulation transcriptionnelle des gènes étudiés.

L'équipe a également, comme perspective d'étudier les gènes les plus fortement régulés par une méthode plus sensible qu'est la RT-PCR en temps réels. Cette approche permettrait d'avoir des données précises sur la quantité d'ARN messagers et non plus des données qualitatives et relatives fournies par la RT-PCR semi-quantitative.

IV Matériel et méthodes

1) Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé lors de cette étude est un plant greffé de *Hevea brasiliensis* (figure 9) en serre sous conditions de culture contrôlées (température moyenne entre 20 et 22), le porte-greffe étant du génotype GT1. Le clone GT1, male stérile, fut très utilisé pendant les années 1960 dans de nombreuses plantations. Le génotype PB260 de *Hevea brasiliensis* a été utilisé, pour les greffons, lors de cette étude. Ces plants seront soumis à différents stress.

2) Traitement et applications de stress abiotiques.

Stress froid

L'application d'un stress froid est réalisée en plaçant le plant dans un sas non chauffé au mois de mars pendant 24 h (courbe de température). L'hévéa étant une plante tropicale, une température descendant jusqu'à 8 °C devrait suffire pour provoquer un stress.

Stress lumineux

L'application d'un stress lumineux s'est effectuée en disposant le plant sous une lampe à mercure pendant 24 heures. Le rayonnement photosynthétique actif (PAR) a été mesuré par un appareil appelé Li-cor modèle Li 189 (quantum/ radiomètre/ photomètre) et la température a été mesurée à l'aide d'un enregistreur de température appelé Tinytag extra TGX 3580 (Gemini Data logger). Ce dispositif entraîne inévitablement un stress supplémentaire dû à la chaleur. Une mesure du potentiel hydrique sera effectuée par une bombe à pression de Scholander sur deux folioles de chaque plante (témoin et stressée).

Stress hydrique

Deux plants ont été utilisés afin de simuler un stress hydrique par un arrêt de l'arrosage pendant 9 semaines et un stress d'excès d'eau par une inondation du plant jusqu'au point de greffe pendant 3 jours. Le plant ayant subi un stress hydrique de sécheresse, provient d'une lignée de PB260 non greffée (seedling), un témoin correspondant sera donc pris pour l'observation du phénotype et pour l'analyse d'expression de gènes.

L'éthylène

Le plant est placé dans un caisson hermétique de 300 litres photo, 24 heures avant le traitement pour limiter les effets liés au transport et aux blessures éventuelles, ensuite le gaz est injecté pour obtenir une concentration d'éthylène de 1ppm (300µl d'éthylène pur) dans le caisson (photo). Les prélèvements sont effectués selon une cinétique de quatre points : 1 heure, 4 heures, 8 heures et 24 heures

La blessure

Les plants ont subi des blessures sur les feuilles, par des pressions tous les 2 centimètres avec une pince crantée (figure 19) et sur l'écorce, par des entailles faites au scalpel espacées de 1 centimètre chacune, sur la tige du greffon. Les prélèvements ont été effectués selon une cinétique de cinq points : 15 minutes, 1 heure, 4 heures, 8 heures et 24 heures après la blessure, chaque plant représentant un point de la cinétique.

3) Extraction et purification des ARNs totaux

Le matériel végétal, feuille et écorce, est prélevé et refroidi directement dans l'azote liquide pour être broyé. La fine poudre obtenue est placée dans la glace, dans un tampon d'extraction (25mM d'isothiocyanate de guanidium GTC SM NaAc, 0,88% de sarcosine, 0,9% de PVP et 1% de β-mercapto-éthanol). Les échantillons sont mélangés 30 secondes afin d'optimiser la lyse des membranes. Une première centrifugation (30 minutes à 4°C à 10000g) permet de précipiter les débris cellulaires. Le surnageant est déposé sur un coussin de chlorure de césium (24mM NaAc, 45,6mM CsCl). Ensuite les tubes sont équilibrés puis centrifugés 20 heures à 20°C à 25000 rpm dans l'ultracentrifugeuse Beckmann en utilisant le rotor SW28. Seuls les ARNs denses sont capables de traverser le coussin de chlorure de césium. Lorsque les 20 heures se sont écoulées, le surnageant est éliminé par pipetage en laissant 1cm de solution qui sera éliminée par retournement du tube. Cette précaution permet d'éviter les contaminations par l'ADN génomique. Le culot est séché 5 minutes puis lavé avec de l'éthanol à 70% et enfin repris dans 200µl d'eau stérile. Les ARNs obtenus sont dosés au spectrophotomètre, la densité optique à 260nm permet d'estimer la quantité d'ARN (1 unité de DO équivaut à 40µg d'ARN). Le dosage et l'intégrité des ARNs sont vérifiés par une électrophorèse sur gel d'agarose (1% P/V, TAE 1X) révélé au bromure d'ethidium pour être visualisés sous UV. Les ARNs sont par la suite aliquotés et conservés à -80°C.

Une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est réalisée pour vérifier la présence d'ADN génomique dans les échantillons d'ARNs totaux extraits. L'amplification est réalisée dans un volume final de 50µl. Celle-ci est effectuée avec un volume d'ARN correspondant à 50-100 ng auquel est rajouté un mélange réactionnel composé de tampon de réaction 10X (Tris 10mM, pH= 8,3), de MgCl₂ (1,5mM), de dNTP (0,04mM), d'amorces du gène codant pour l'actine (choisi à cheval sur un intron) (0,04µM) et de Taq polymérase (1u/µl). Un échantillon d'ADN génomique d'hévéa est utilisé comme contrôle positif. Les échantillons sont incubés 1 minutes et 30 secondes à 94°C suivi de 40 cycles, composés chacun de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 58°C et 1 minute et 30 secondes d'élongation à 72°C, la réaction se terminant par une élongation finale de 10 minutes à 70°C. Les produits d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose (1% P/V, TAE 1X) puis révélés au bromure d'éthidium.

Les échantillons d'ARN qui se révèlent contaminés par de l'ADN génomique sont traités par une digestion à la DNase (kit Turbo DNA-FREE d'Ambion). La réaction se fait à partir de 8 ng d'ARN totaux dans un volume final de 40 µl composé de Tampon de la DNase (10X, 4µl), de DTT (0,1 M, 2µl, Invitrogen), d'inhibiteur de Rnase (RiboLock, Fermentas, 40U/µl) et de DNase TURBO (2U/µl). Les échantillons sont incubés pendant 15min à 37°C. Ensuite, un inactivateur de DNase (DNase Inactivation Reagent TURBO) est ajouté aux échantillons d'ARN, l'inactivation de l'enzyme se fait pendant 2 minutes à température ambiante en mélangeant les tubes. Une centrifugation (12 000g , 2 minutes, 4°C) permet de récupérer le surnageant dans lesquels se trouve les ARNs purifiés.

4) Synthèse d'ADNc

La synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) se fait par transcription inverse. Les échantillons d'ARNs (4µg) sont mis en présence d'Oligo (DT)₁₂ VN (100pmol, V= C, G, A, N= G, A, T, C) pendant 5 minutes à 70°C, température qui permet la dénaturation des ARNs, puis les tubes sont refroidis 3 minutes dans la glace. Un mélange réactionnel composé de tampon de réaction (5X, RevertAidTM, Fermentas), de dNTP (10mM) et d'inhibiteur de RNase (RiboLock, Fermentas, 20 U) est ajouté aux ARNs. Les tubes sont réchauffés pendant 5 minutes à 37°C pour pouvoir rajouter la transcriptase inverse (RevertAidTM M.MVL, Fermentas) qui va synthétiser les brins d'ADNc pendant 60 minutes à 42°C. La réaction est par la suite stoppée en disposant les tubes pendant 10 minutes à 70°C.

La qualité des ADNc est vérifiée par PCR avec les amorces du gène actine en utilisant 1µl d'ADNc comme matrice. Les conditions d'amplification sont les mêmes que pour la détection de contamination par les ADN génomique.

5) La RT PCR semi-quantitative

Cette méthode est utilisée pour suivre l'expression de gènes. Elle consiste en une co-amplification du gène étudié et d'un gène de référence. Le gène de référence choisi pour cette étude est l'actine. Lors de ce travail, l'expression de sept gènes va être étudiée. Ces gènes codent pour : la glutamylcystéine ligase chloroplastique (GCLchloro), la glutamylcystéine ligase cytosolique (GCLcyto), la cuivre-zinc-superoxyde dismutase (CuZnSOD), la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD), la catalase (CAT) et deux ascorbate peroxydases (APX1 et APX2). Les séquences de ces gènes sont connus chez *Hevea brasiliensis* et vont permettre de définir des amorces spécifiques pour l'amplification des ADNc. Quelques conditions doivent être respectées lors du choix des amorces : les températures de fusion (T_m) doit être identiques pour le gène étudié et pour le gène de référence afin que l'hybridation puisse se faire à la même température et la taille du produit amplifié doit être différente pour les deux gènes afin de les distinguer sur le gel de migration. La co-amplification est réalisée dans un volume final de 50µl, dans un mélange réactionnel composé de tampon de réaction 10X (Tris 10mM ; pH : 8,3 ; KCl 50mM, $MgCl_2$ 1,5mM), de $MgCl_2$ (0,05mM), de dNTP (0,04µM), d'amorces du gène codant pour l'actine (0,04µM) et d'amorces du gène étudié (0,04µM) et de Taq polymérase (1u/µl). Les quantités d'ADN complémentaires peuvent varier, afin que l'expression de l'actine soit constitutive. Les conditions d'amplification sont les mêmes que précédemment excepté le nombre de cycles qui varie entre 15 et 40 selon les gènes étudiés. La migration s'effectue sur un gel d'agarose (2% P/V, TAE 1X) pour optimiser la séparation des produits d'amplification correspondant à l'actine et au gène étudié.

6) Analyse des photos.

Les photos, en format TIFF et en négatif noir/blanc, ont été analysées par le logiciel ImageQuant d'Amersham selon les instructions du fournisseur. Les données ont été exportées vers Excel pour la réalisation des graphiques.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Allen, R.D., R.P. Webb, and S.A. Schake. 1997. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med* 23:473-9.
- Alscher, R.G., N. Erturk, and L.S. Heath. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53:1331-41.
- Archer, B.L. 1960. The proteins of *Hevea brasiliensis* Latex. 4. Isolation and characterization of crystalline hevein. *Biochem J* 75:236-40.
- Audley, B.G., B.L. Archer, and I.B. Carruthers. 1976. Metabolism of ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) and related compounds in *Hevea brasiliensis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 4:183-200.
- Baek, K.H., and D.Z. Skinner. 2006. Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variants in near isogenic lines of wheat during cold acclimation. *Plant Cell Rep* 25:223-30.
- Bandurski, R.S., and H.J. Teas. 1957. Rubber Biosynthesis in Latex of *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol* 32:643-8.
- Broekaert, I., H.I. Lee, A. Kush, N.H. Chua, and N. Raikhel. 1990. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7633-7.
- Chaparzadeh, N., M.L. D'Amico, R.A. Khavari-Nejad, R. Izzo, and F. Navari-Izzo. 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiol Biochem* 42:695-701.
- Chrestin, H. 1985a. La stimulation à l'éthrel de l'hévéa jusqu'où ne pas aller trop loin. *Caoutchouc et Plastiques* n° 647/648(75-78).
- Chrestin, H. 1985b. International Rubber Conference, Kuala Lumpur.
- Compagnon, p. 1986. Le caoutchouc naturel.
- Cornish, K. 1993. The separate roles of plant cis and trans prenyl transferases in cis-1,4-polyisoprene biosynthesis. *Eur J Biochem* 218:267-71.
- Coupè, M., and H. Chrestin. 1989. Physico-Chemical and Biochemical Mechanisms of Hormonal (Ethylene) Stimulation, p. 295-321, *In* B. R. CRC press, ed. Physiology of Rubber Tree Latex.
- Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranova, M. Van Montagu, D. Inze, and F. Van Breusegem. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57:779-95.
- d'Auzac, J., J.C. Prevot, and J.L. Jacob. 1995. What's new about lutoïds? A vacuolar system model from *Hevea* latex. *Plant Physiol. Biochem.* 33:765-777.
- d'Auzac, J., J.L. Jacob, J.C. Prevot, A. Clement, R. Gallois, H. Crestin, R. Lacote, and V. Pujade-Renaud. 1997. The regulation of *cis*-polyisoprène production (natural rubber) from *Hevea brasiliensis*. *Recent Res. Devel. in Plant Physiol.*:273-332.
- de Faÿ, E., and J.L. Jacob. 1989. Anatomical Organisation of the Laticiferous System in the Bark, p. 3-14, *In* B. R. CRC press, ed. Physiology of Rubber Tree Latex.
- Dennis, M.S., and D.R. Light. 1989. Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis. *J Biol Chem* 264:18608-17.
- Foyer, C.H., and G. Noctor. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17:1866-75.

- Gechev, T., H. Willekens, M. Van Montagu, D. Inze, W. Van Camp, V. Toneva, and I. Minkov. 2003. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J Plant Physiol* 160:509-15.
- Gidrol, X., H. Chrestin, H.L. Tan, and A. Kush. 1994. Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J Biol Chem* 269:9278-83.
- Gupta, A.S., J.L. Heinen, A.S. Holaday, J.J. Burke, and R.D. Allen. 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1629-33.
- Hepper, C.M., and B.G. Audley. 1969. The biosynthesis of rubber from beta-hydroxy-beta-methylgluarylcoenzyme A in *Hevea brasiliensis* latex. *Biochem J* 114:379-86.
- Jacob, J.L., J.C. Prevot, and R. Lacrotte. 1994. L'encoche sèche chez *Hevea brasiliensis*. *Plantations, recherche, développement*:15-21.
- Jacob, J.L., J. d'Auzac, J.C. Prevot, and J.B. Serier. 1995. Une usine à caoutchouc naturel : l'hévéa. *La Recherche* 26(276):538-545.
- Jez, J.M., R.E. Cahoon, and S. Chen. 2004. Arabidopsis thaliana glutamate-cysteine ligase: functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. *J Biol Chem* 279:33463-70.
- Karpinski, S., H. Reynolds, B. Karpinska, G. Wingsle, G. Creissen, and P. Mullineaux. 1999. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis. *Science* 284:654-7.
- Kekwick, R.G.O. 1989. The formation of Polyisoprenoids in Hevea Latex, p. 145-165, *In* B. R. CRC press, ed. *Physiology of Rubber Tree Latex*.
- Kush, A., E. Goyvaerts, M.L. Chye, and N.H. Chua. 1990. Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1787-90.
- Light, D.R., and M.S. Dennis. 1989. Purification of a prenyltransferase that elongates cis-polyisoprene rubber from the latex of *Hevea brasiliensis*. *J Biol Chem* 264:18589-97.
- Mahajan, S., and N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* 444:139-58.
- McKersie, B.D., Y. Chen, M. de Beus, S.R. Bowley, C. Bowler, D. Inze, K. D'Halluin, and J. Botterman. 1993. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* 103:1155-63.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405-10.
- Mooibroek, H., and K. Cornish. 2000. Alternative sources of natural rubber. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:355-65.
- Neill, S., R. Desikan, and j. Hancock. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*:388-395.
- Noctor, G., and C.H. Foyer. 1998. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249-279.
- Prasad, T.K., M.D. Anderson, B.A. Martin, and C.R. Stewart. 1994. Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide. *Plant Cell* 6:65-74.
- Pujade-Renaud, V., A. Clement, C. Perrot-Rechenmann, J.C. Prevot, H. Chrestin, J.L. Jacob, and J. Guern. 1994. Ethylene-Induced Increase in Glutamine Synthetase Activity and mRNA Levels in *Hevea brasiliensis* Latex Cells. *Plant Physiol* 105:127-132.
- Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38:995-1014.
- Song, X.S., W.H. Hu, W.H. Mao, J.O. Ogwen, Y.H. Zhou, and J.Q. Yu. 2005. Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. *Plant Physiol Biochem* 43:1082-8.

- Van Camp, W., K. Capiou, M. Van Montagu, D. Inze, and L. Sliotoen. 1996. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol* 112:1703-14.
- Wang, F.Z., Q.B. Wang, S.Y. Kwon, S.S. Kwak, and W.A. Su. 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *J Plant Physiol* 162:465-72.
- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 322 (Pt 3):681-92.